

Model-based analysis of Interferon- β induced signaling pathway in IFN-stimulated A549 cell line

Ivan Yuste Cobo

Institute of Automatic Control, Silesian University of Technology, Akademicka
16, 44-101 Gliwice, Poland

Escuela Politécnica Superior, Universidad Carlos III de Madrid,
Avda. Universidad 10, 28911 Leganés, España

e-mail: ivanyc@gmail.com

INDEX:

INTRODUCTION	2
BACKGROUND	3
THE INITIAL MODEL	4
Free STAT1 and STAT2 in cytoplasm	6
Free STAT1 and STAT2 in nucleus	7
Phosphorylated free STATs in cytoplasm	7
Phosphorylated STAT1 complexes	8
ADAPTING MODEL TO A549	11
OMITTING PIAS COMPLEX	12
SLOWING DOWN CREATION RATE OF PIAS COMPLEX	13
WITH NO PIAS COMPLEX AND DECREASE OF HOMODIMER RATES	14
IRF1 STABLE AND UNSTABLE PROTEIN	15
IRF1 STABLE AND UNSTABLE PROTEIN MEDIATING STAT1 STAT1	16
IRF1 STABLE AND UNSTABLE PROTEIN MEDIATING STAT1 STAT2	18
IRF1 ACTIVE AND INACTIVE TRANSCRIPT	19
IRF1 ACTIVE AND INACTIVE TRANSCRIPT WITH STAT1 STAT1	20
IRF1 ACTIVE AND INACTIVE TRANSCRIPT WITH STAT1 STAT2	22
IRF1 ACTIVE AND INACTIVE TRANSCRIPT WITH ACTIVATION	23
CONCLUSIONS	25
TRANSLATION INTO SPANISH	26
INTRODUCCIÓN	27
ANTECEDENTES	28
MODELO DE PARTIDA	29
ADAPTACIÓN DEL MODELO A UNA NUEVA LÍNEA CELULAR	37
OMISIÓN DEL COMPUESTO PIAS	38
TASA DE CREACIÓN DEL COMPUESTO PIAS BAJA	40
SIN COMPUESTO PIAS Y TASA DE CREACIÓN DE HOMODÍMEROS BAJA	42
PROTEÍNA IRF1 ESTABLE E INESTABLE	43
PROTEÍNA IRF1 ESTABLE E INESTABLE MEDIANTE STAT1 STAT1	44
PROTEÍNA IRF1 ESTABLE E INESTABLE MEDIANTE STAT1 STAT2	46
TRANSCRIPCIÓN ACTIVA E INACTIVA DE IRF1	48
TRANSCRIPCIÓN ACTIVA E INACTIVA DE IRF1 CON STAT1 STAT1	49
TRANSCRIPCIÓN ACTIVA E INACTIVA DE IRF1 CON STAT1 STAT2	51
TRANSCRIPCIÓN ACTIVA E INACTIVA DE IRF1 CON ACTIVACIÓN	52
CONCLUSIÓN	53
REFERENCES	54
LIST OF FIGURES	55

INTRODUCTION

Interferon- β induced JAK-STAT signalling pathways contribute to mucosal immune recognition and an anti-viral state. Though the main molecular mechanisms constituting these pathways are known, neither the detailed structure of regulatory network, nor its dynamics has yet been investigated. The objective of this work is to create a mathematical model for the activation phase of the JAK-STAT pathway that would serve two purposes:

- 1) To reproduce experimental results in simulation of both early and late response to Interferon- β stimulation.
- 2) To explain experimental phenomena generating new hypotheses about regulatory mechanisms that cannot yet be tested experimentally.

Experimentally determined time dependent changes in the major components of this pathway were used to build a mathematical model describing pathway dynamics in the form of ordinary differential equations. The model reproduced two distinct phases of response – an early response resulting in the production of IRF1 through Tyr-phosphorylated STAT1 DNA-binding complexes, and a late response mediated by newly synthesized IRF1 controlling STAT1, LMP2 and TAP1 expression.

These data show the epithelial JAK-STAT pathway is subject to novel dynamic negative control mechanisms. Mathematical modeling is shown here to be a useful tool in investigation of regulatory pathways, not only serving to reproduce experimental results but also helping to formulate novel hypotheses about processes controlling the pathway[1].

BACKGROUND

The innate immune response is a first line of defence to protect against infection by rapidly acting signaling processes stimulated by the recognition of pathogenic organismal patterns [2]. In the case of viral infections, cell surface and endosomal localized TLRs or intracellular helicases RIG-I/MDA-5 sense the presence of dsRNA intermediates, and upregulate signaling pathways that ultimately result in the enhanced expression of cytokines that serve to limit viral spread until the adaptive immune response develops [3]. Of these cytokines, the highly inducible interferons (IFNs) are a central arm of the innate immune response.

There are three types of IFN, each one expressed in different cells, with different roles in immune defence and also with different signalling pathways. In this research, we're focusing in one isoform of the Type I IFN, IFN- β . This is primary produced by epithelial cells, is an important first line of contact between internal milieu and invading viruses [4]. It is strongly induced by viral infection and works in a paracrine manner to limit viral replication.

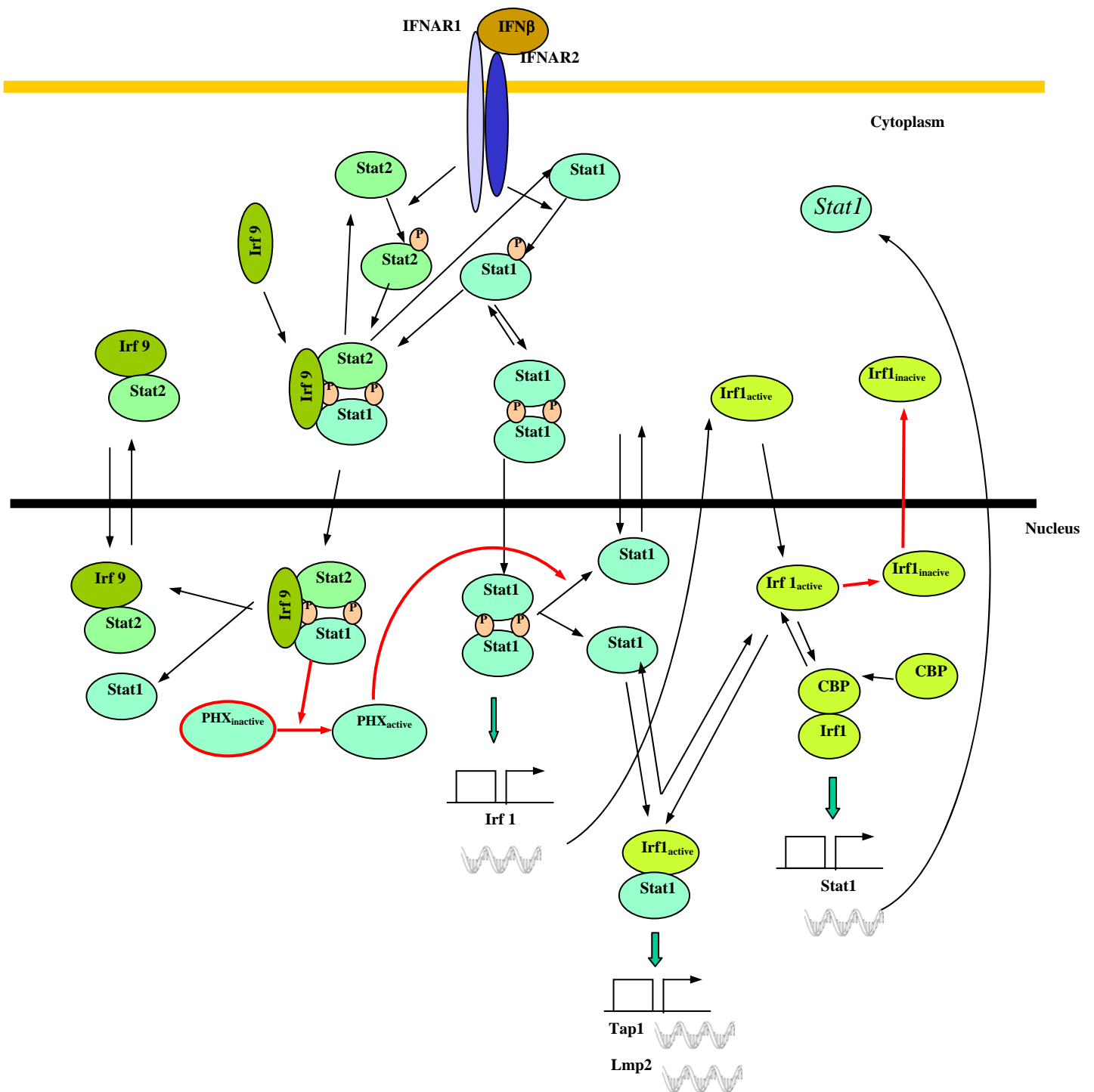
So, at next, we will work with a dynamic model of Type I IFN signalling pathways using ordinary differential equations (ODEs), which is already built in order to model experimental data from epithelial cells.

It's observed that in this paper it's not explained the biological reasoning, procedures, hypothesis and explanations. This is actually because it's not a part of this study. So all those are explained (including positive autoregulatory loops, feed-forward activation and negative feedback regulation) in the main paper written by Jaroslaw Smieja, Mohammad Jamaluddin, Allan R. Brasier and Marek Kimmel.

THE INITIAL MODEL

IFN- β activates its receptors to result in phosphorylation of STAT1 and STAT2. Subsequently, STAT1 homodimers are formed (among others) inducing IRF1 transcription. In the nucleus, the STATs are dephosphorylated, their complexes dissociate, and unphosphorylated STATs are exported from the nucleus. Newly synthesized IRF1 translocates to the nucleus, where it subsequently controls late gene expression, including TAP-1/LMP-2 and STAT1. Processes that lead to the expression of early genes (or, more accurately, an early IRF1 gene) will be referred to as the *early system response* in this and the subsequent sections. The term *late system response* is used to describe all events that occur after IRF1 gene is transcribed, including its translation, activation, nuclear import, formation of complexes, expression of STAT1, LMP2 and TAP1 genes, and, finally, cytoplasmic accumulation of IRF1.

Due to complexity of signaling networks and their intertwining, this analysis is constrained to only the most important processes. Seven basic processes were used in the model formulation: formation and dissociation of protein complexes, phosphorylation and dephosphorylation of molecules, gene transcription, translation of mRNA and degradation of molecules. The following figure shows the design of the pathway modelled:



The ODEs governing the dynamics of the signalling pathway are presented and briefly explained at next, but first of all, the notation used must be specified:

- Variables names correspond to proteins, complexes and transcripts they represent; for greater clarity they are put in brackets.
- Variables denote cytoplasmic molar concentrations if no subscripts are present, while nuclear concentration is represented by subscript n .
- Concentration of mRNA transcripts is denoted by t subscript and always refers to cytoplasmic concentration; the transport of mRNA to the cytoplasm is assumed to be very fast in relation to other processes and therefore neglected in the model.
- Phosphorylated form of proteins is indicated by p subscript.
- Subscripts *active* and *inactive* are used to distinguish respective states of the molecules
- *Activation* is a binary variable, equal to 1 for the time of IFN stimulation, 0 otherwise
- $k_v = V/U$ – ratio of cytoplasmic and nuclear volumes

Free STAT1 and STAT2 in cytoplasm

$$\begin{aligned} \frac{d(STAT1)}{dt} = & k_{transl} \cdot (STAT1_t) - k_{s1deg} \cdot (STAT1) - i_{s1} \cdot (STAT1) + e_{s1} \cdot (STAT1)_n \\ & - Activation \cdot \frac{k_{s1_phos} \cdot (STAT1)}{1 + k_{s1_phos_sat} \cdot (STAT1)} + k_{s1_deph} \cdot (STAT1_p) \\ & + 2k_{inv_s1s1} \cdot (STAT1_p | STAT1_p) + k_{inv_s1s2} \cdot (STAT1_p | STAT2_p) \end{aligned} \quad (1)$$

$$\begin{aligned} \frac{d(STAT2)}{dt} = & k_{transl} \cdot (STAT2_t) - k_{s2deg} \cdot (STAT2) - i_{s2} \cdot (STAT2) + e_{s2} \cdot (STAT2)_n \\ & - Activation \cdot \frac{k_{s2_phos} \cdot (STAT2)}{1 + k_{s2_phos_sat} \cdot (STAT2)} + k_{s2_deph} \cdot (STAT2_p) \\ & + k_{inv_s1s2} \cdot (STAT1_p | STAT2_p) \end{aligned} \quad (2)$$

Free STAT1 and STAT2 in nucleus

$$\begin{aligned}
\frac{d(STAT1)_n}{dt} = & -k_{s1 \text{ deg}} \cdot (STAT1)_n + k_v i_{s1} \cdot (STAT1) - k_v e_{s1} \cdot (STAT1)_n \\
& + 2k_{inv_s1s1_n} \cdot (STAT1_p | STAT1_p)_n + k_{inv_s1s2_n} \cdot (STAT1_p | STAT2_p)_n \\
& - k_{s1i1} \cdot (STAT1)_n \cdot (IRF1_{active})_n + k_{inv_s1i1} (STAT1 | IRF1)_n \\
& + 2 \cdot \bar{k}_{inv_xs1s1} \cdot (PHX | STAT1_p | STAT1_p)_n
\end{aligned} \tag{3}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d(STAT2)_n}{dt} = & -k_{s2 \text{ deg}} \cdot (STAT2)_n + k_v i_{s2} \cdot (STAT2) - k_v e_{s2} \cdot (STAT2)_n \\
& + k_{inv_s1s2_n} \cdot (STAT1_p | STAT2_p)_n
\end{aligned} \tag{4}$$

Phosphorylated free STATs in cytoplasm

$$\begin{aligned}
\frac{d(STAT1_p)}{dt} = & -k_{s1p \text{ deg}} \cdot (STAT1_p) \\
& + Activation \cdot \frac{k_{s1_phos} \cdot (STAT1)}{1 + k_{s1_phos_sat} \cdot (STAT1)} - k_{s1_deph} \cdot (STAT1_p) \\
& - 2k_{s1s1} \cdot (STAT1_p) \cdot (STAT1_p) - k_{s1s2} \cdot (STAT1_p) \cdot (STAT2_p)
\end{aligned} \tag{5}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d(STAT2_p)}{dt} = & -k_{s2 \text{ deg}} \cdot (STAT2_p) \\
& + Activation \cdot \frac{k_{s2_phos} \cdot (STAT2)}{1 + k_{s2_phos_sat} \cdot (STAT2)} - k_{s2_deph} \cdot (STAT2_p) \\
& - k_{s1s2} \cdot (STAT1_p) \cdot (STAT2_p)
\end{aligned} \tag{6}$$

Phosphorylated STAT1 complexes

$$\begin{aligned} \frac{d(STAT1_p | STAT1_p)}{dt} = & k_{s1s1} \cdot (STAT1_p) \cdot (STAT1_p) - k_{inv_s1s1} \cdot (STAT1_p | STAT1_p) \\ & - i_{s1s1} \cdot (STAT1_p | STAT1_p) \end{aligned} \quad (7)$$

$$\begin{aligned} \frac{d(STAT1_p | STAT2_p)}{dt} = & k_{s1s2} \cdot (STAT1_p) \cdot (STAT2_p) - k_{inv_s1s2} \cdot (STAT1_p | STAT2_p) \\ & - i_{s1s1} \cdot (STAT1_p | STAT2_p) \end{aligned} \quad (8)$$

The dynamics in the nucleus is given by:

$$\begin{aligned} \frac{d(STAT1_p | STAT1_p)_n}{dt} = & -k_{inv_s1s1_n} \cdot (STAT1_p | STAT1_p)_n + k_v i_{s1s1} \cdot (STAT1_p | STAT1_p) \\ & - k_{xs1s1} \cdot (STAT1_p | STAT1_p)_n \cdot (PHX_{active})_n \end{aligned} \quad (9)$$

$$\begin{aligned} \frac{d(STAT1_p | STAT2_p)_n}{dt} = & -k_{inv_s1s2_n} \cdot (STAT1_p | STAT2_p)_n + k_v i_{s1s1} \cdot (STAT1_p | STAT2_p) \end{aligned} \quad (10)$$

Free inactive and active PHX phosphatase

According to the assumed model, it is localized in the nucleus.

$$\frac{d(PHX_{inactive})_n}{dt} = -k_{activ} \cdot (PHX_{inactive})_n \cdot (STAT1_p | STAT2_p)_n \quad (11)$$

$$\begin{aligned} \frac{d(PHX_{active})_n}{dt} = & k_{activ} \cdot (PHX_{inactive})_n \cdot (STAT1_p | STAT2_p)_n \\ & - k_{xs1s1} (STAT1_p | STAT1_p)_n \cdot (PHX_{active})_n + k_{inv_xs1s1} (PHX | STAT1_p | STAT1_p)_n \end{aligned} \quad (12)$$

The PHX/STAT1/STAT1 complex

$$\begin{aligned} \frac{d(PHX | STAT1 | STAT1)_n}{dt} = \\ = k_{xs1s1} \cdot (STAT1_p | STAT1_p)_n \cdot (PHX_{active}) - k_{inv_xs1s1} \cdot (PHX | STAT1_p | STAT1_p)_n \end{aligned} \quad (13)$$

Free IRF1 protein in cytoplasm and nucleus.

$$\begin{aligned} \frac{d(IRF1_{active})}{dt} = k_{transl} \cdot (IRF1_t) - k_{i1deg} \cdot (IRF1_{active}) \\ - i_{i1} \cdot (IRF1_{active}) + e_{i1} \cdot (IRF1_{active})_n \end{aligned} \quad (14)$$

$$\begin{aligned} \frac{d(IRF1_{active})_n}{dt} = -k_{i1deg} \cdot (IRF1_{active})_n - k_{inact_i1} \cdot (IRF1_{active})_n \\ + k_v i_{i1} \cdot (IRF1_{active}) - k_v e_{i1} \cdot (IRF1_{active})_n \\ - k_{s1i1} \cdot (IRF1_{active})_n \cdot (STAT1)_n + k_{inv_s1i1} \cdot (IRF1 | STAT1)_n \end{aligned} \quad (15)$$

$$\frac{d(IRF1_{inactive})_n}{dt} = k_{inact_i1} \cdot (IRF1_{active})_n - k_{i1deg} \cdot (IRF1_{inactive})_n - k_v e_{i1_in} \cdot (IRF1_{inactive})_n \quad (16)$$

$$\frac{d(IRF1_{inactive})}{dt} = -k_{i1deg} \cdot (IRF1_{inactive}) + e_{i1_in} \cdot (IRF1_{inactive})_n \quad (17)$$

IRF1/STAT1 complex in the nucleus

$$\begin{aligned} \frac{d(IRF1 | STAT1)_n}{dt} = k_{s1i1} \cdot (IRF1_{active})_n \cdot (STAT1)_n - k_{inv_s1i1} \cdot (IRF1 | STAT1)_n \\ - k_{s1i1_deg} \cdot (IRF1 | STAT1)_n \end{aligned} \quad (18)$$

IRF1, STAT1, TAP1 and LMP2 mRNA

$$\frac{d(IRF1_t)}{dt} = k_{i1tprod} + v_{i1t} \cdot (STAT1_p | STAT1_p)_n - k_{i1t_deg} \cdot (IRF1_t) \quad (19)$$

$$\frac{d(TAP1_t)}{dt} = k_{t1tprod} + v_{t1t} \cdot (IRF1 | STAT1)_n - k_{t1t_deg} \cdot (TAP1_t) \quad (20)$$

$$\frac{d(LMP2_t)}{dt} = k_{l2tprod} + v_{l2t} \cdot (IRF1 | STAT1)_n - k_{l2t_deg} \cdot (LMP2_t) \quad (21)$$

$$\frac{d(STAT1_t)}{dt} = k_{s1tprod} + v_{s1t} \cdot (TF_{s1})_n - k_{s1t_deg} \cdot (STAT1_t) \quad (22)$$

$$\frac{d(STAT2_t)}{dt} = k_{s2tprod} - k_{s2t_deg} \cdot (STAT2_t) \quad (23)$$

Additional variable $(TF_{s1})_n$

To calculate $(TF_{s1})_n$ in (22) the following equations are

$$\frac{dy_i}{dt} = -\frac{1}{T} \cdot y_i + \frac{1}{T} \cdot y_{i-1}, \quad (24)$$

Where $y_0 = (IRF1)_n$, $i = 1, 2, 3, 4$, and $(TF_{s1})_n = y_4$.

The results and conclusions that turned out from this first study are not shown here, because it's not the case of the current research. Just mention that this work showed how helpful are mathematical models to understand biological and chemical processes. In this case, two novel unknown mechanisms were discovered: regulating expression of early genes, consisting in regulation of STAT1 homodimer level, and another, controlling late system responses through accumulation of IRF1 in cytoplasm. And also now, we are able to understand the comprehensive experimental results showing IFN- β induced cell response is presented, showing both early and late response of the cellular regulatory system.

ADAPTING MODEL TO A549

The following part of the study is focused in adapting the mentioned model to other cell line, the A549 epithelial cell. What it's going to be described here are the attempts of adapting the model created before by means of modifying it with the help of some hypotheses we manage. Hence we will realize whether the current model is valid for this cell line or not. Moreover, it's interesting to discover if these new hypotheses are valid not only for this cell line, but for other ones.

We must notice here, that the first work done in this part has been to check if with the data of the new cell line, including concentration in nucleus and cytoplasm of IRF1 and STAT1 (phosphorylated and unphosphorylated). Also there have been measured levels of IRF1, STAT1, LMP2 and TAP1 mRNA. Notice also that we don't have experimental data for concentrations of STAT1 homodimers in nucleus, so the comparison of the data we have and the simulation results are not reliable.

Thus the next part of the study will explain all hypotheses we thought could be biologically plausible.

OMITTING PIAS COMPLEX

The first guess we're managing is get rid of PIAS complex, which is needed in the IRF1 translation process, mediating the homodimer STAT1|STAT1 in the nucleus. We thought that the mechanism involving this action, and late homodimer dissociation could be possible without PIAS complex help, or maybe, this is possible thanks to other protein. Even if actually the PIAS complex is the one involved here, perhaps its action is negligible.

The change made in this case consists simply in set up the variable "kpiass1s1", which stores the value of the creation rate of the complex made up of PIAS protein and the homodimer STAT1|STAT1 to zero. We can find this variable in the parameters file, specifically in the complexes creation rate section. Doing this we assure that at the beginning of the simulation there's no complex of this type. We do not use this complex in any part of the pathway but here, so there won't be any production of PIAS protein, so we just reject the active action of this protein in the model.

The results we obtain are that there is a direct linear relation between the number of molecules of phosphorylated STAT1 either in cytoplasm and nucleus. In both case, we notice that there is a peak preceded of a fast increasing of the number of molecules after ~2 hours of simulation. Then the number of molecules establishes (~70000 molecules in nucleus and ~2500 in the cytoplasm). The total number of STAT1 proteins is proportional also in both, nucleus and cytoplasm, growing up after 5 hours of simulation (Figure1).

Regarding of the IRF1 mRNA and its relation with STAT1 homodimers. We cannot say that getting rid of PIAS proteins is a good option, due to the observation that both parameters, in this case, have no relation between themselves or with experimental data. And this is an important point that we cannot forget. So our conclusion is that we can not get rid of PIAS protein for our research (Figure 2).

SLOWING DOWN CREATION RATE OF PIAS COMPLEX

The next step in our study is, after we have checked that getting rid of PIAS protein doesn't work, is discover what happen, then, if instead of having null quantity of this molecule (forming the PIAS|STAT1|STAT1 complex), we are reducing the creation rate of this complex. So next change is simple, just change the initial value of this parameter which is 0.7 1/uM*s . After some attempts, we conclude that the value that fixes best is 0.2 1/uM*s .

Taking into account the shape of the plots which show the concentration of STAT1 homodimers in nucleus and IRF1 mRNA of our procedure, we can assure that these two variables are linearly dependent, hence the conclusion we make is STAT1 is the transcription factor for IRF1 mRNA, cause we can see that the shape of both curves are similar, but the one plotting the STAT1 homodimers in nucleus increases faster than the IRF1 mRNA forming a peak at hour 1 and 2.5 respectively. But again, the simulation doesn't fix good enough to the experimental data. The IRF1 protein and STAT mRNA are related too: first IRF1 protein increases because it is synthesized first in the positive loop, after some time the level of STAT protein increases too because of the negative feedback, and then, both decreases downwards a constant (Figure 3).

About STAT1 phosphorylated, the values doesn't fix to the quantitative data, but we can say that the shape of plots, which are not good, are approximating what we expect, an initial and very fast growth, reaching a peak at the beginning of simulation, and after decreases until reaches a constant value (40000 for molecules in nucleus and ~ 2500 in cytoplasm). About STAT1 protein the only thing that we can assure is that grows upwards a constant whose value we cannot approximate (Figure 4).

WITH NO PIAS COMPLEX AND DECREASE OF HOMODIMER RATES

The next question we have to solve is what happens if we get rid of PIAS proteins in our model and decrease the creation and phosphorylation rates of STAT1|STAT1 homodimers.

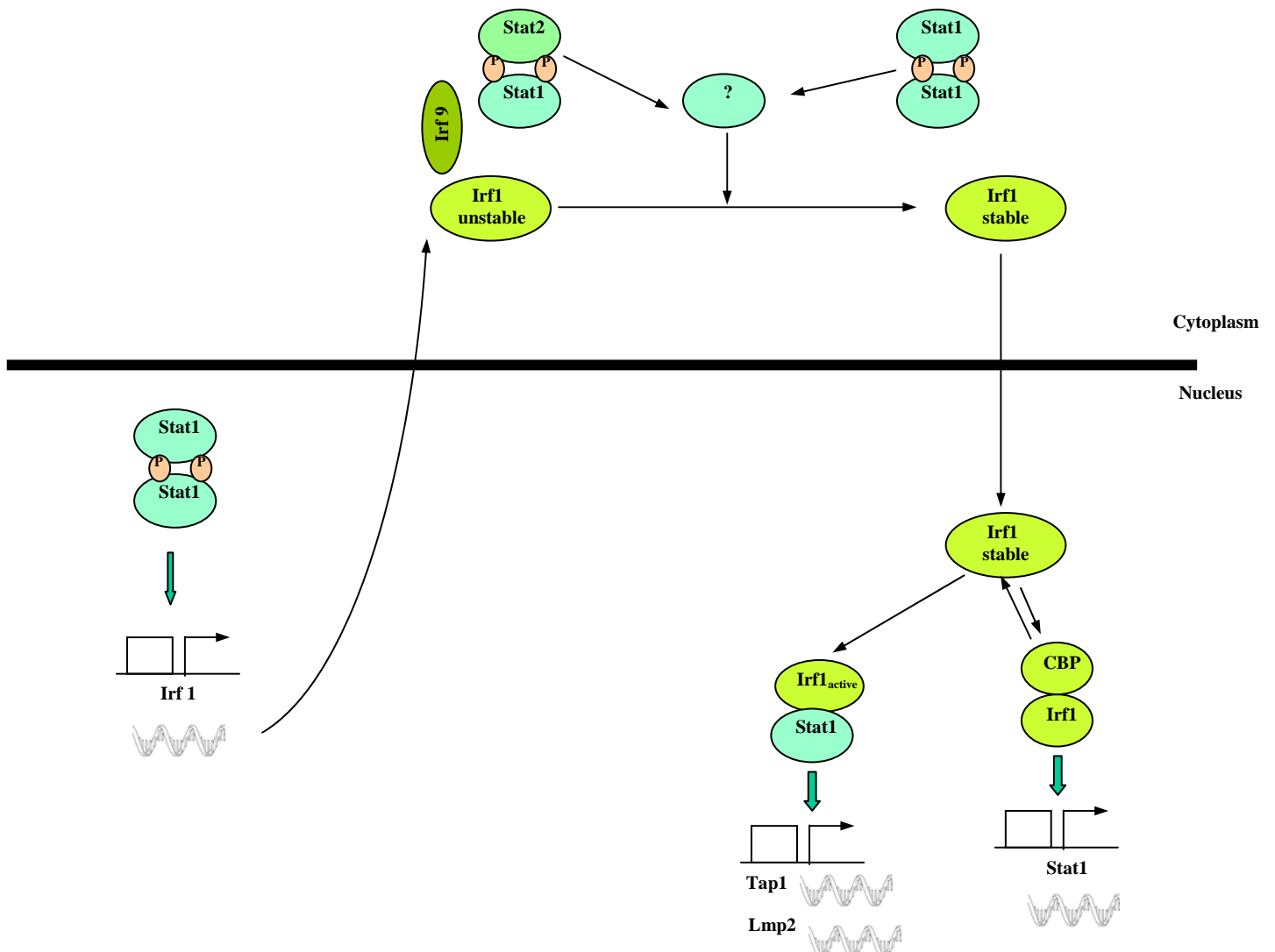
We have not notice any change in decreasing the creation rate (results not shown). We focus then, in set the variable of the complex formed by STAT1 homodimer and PIAS protein equal to 0. Then for decreasing the phosphorylation rate of STAT1 homodimer in the nucleus, since there's no sense in doing this with homodimers in the cytoplasm due to what we are interested is in fixing the procedures related with IRF1 mRNA, the negative feedback regulation. For doing this, we only have to increase the value of the variable corresponding to the half time for homodimer in the nucleus.

In this case, we can see, obviously, that STAT1 homodimers and IFR1mRNA are linear independent and that the first is involved in the creation of the second one. The results for IFR1mRNA are better, due the shape is the one we need: first increase until reach a peak, then a slow decrease and after slower increase, leading to a constant value; but again the simulation doesn't fix to the experimental data (Figure 5).

The rest of the parameters we are interested in measuring are omitted in this paper due not to show any interesting or new results.

IRF1 STABLE AND UNSTABLE PROTEIN

In this section we postulate a new hypothesis about IRF1 protein pathway. We assume now that, like before, IRF mRNA is a product of transcription mediated by the homodimer STAT1|STAT1 in the nucleus. Then this IRF mRNA is exported from nucleus to cytoplasm, as an unstable protein of IRF1. This protein, in the cytoplasm, became stable because of the action of an unknown factor, either STAT1|STAT1 homodimer or STAT1|STAT2 heterodimer. After this, the stable protein is imported into the nucleus, where it acts like was described before: forming complex with STAT1 molecules and with CBP molecules for the transcript of STAT1 proteins. The following shows this thesis with graphics:



IRF1 STABLE AND UNSTABLE PROTEIN MEDIATING STAT1|STAT1

Now we are going to apply the previous thesis using the homodimer STAT1|STAT1 as the activation factor in the cytoplasm that makes the IRF1 protein become stable. For doing this we will maintain out of the network the action of PIAS proteins and a low phosphorylation rate for homodimers in nucleus. What we must change are some equations (ODEs) from the model file, the ones that refers to IRF1 pathway, but we will maintain the equation 15 the same, due to it refers to IRF mRNA transcript dependent of homodimer concentration. Equations 16, 17, 18 and 19 now are like this:

Equation 16 - IRF1 unstable in cytoplasm:

$$\frac{d(IRF1_{unstable})_c}{dt} = k_{translation_il} \cdot (IRF1_{transcript})_n - k_{il\ deg} \cdot (IRF1_{unstable})_c + e_{il_un} \cdot (IRF1_{unstable})_c - i_{il_un} \cdot (IRF1_{unstable})_n$$

Equation 17 - IRF1 stable in cytoplasm:

$$\frac{d(IRF1_{stable})_c}{dt} = k_{activ_il} \cdot (STAT1_p | STAT1_p)_c - k_{il\ deg} \cdot (IRF1_{stable})_c - i_{il_sn} \cdot (IRF1_{stable})_c + e_{il_sn} \cdot (IRF1_{stable})_n$$

Equation 18 - IRF1 stable in nucleus:

$$\begin{aligned} \frac{d(IRF1_{stable})_n}{dt} = & k_v i_{il_sc} \cdot (IRF1_{stable})_c - k_v e_{il_sn} \cdot (IRF1_{stable})_n - k_{il\ deg} \cdot (IRF1_{stable})_n - k_{inact_il} \cdot (IRF1_{stable})_n \\ & - k_{slil} \cdot (IRF1_{stable} | STAT1)_n + k_{slil_deg} \cdot (IRF1_{stable} | STAT1)_n \end{aligned}$$

Equation 19 - IRF1 unstable in nucleus:

$$\frac{d(IRF1_{unstable})_n}{dt} = k_{v_{i1_sc}} \cdot (IRF1_{unstable})_n - k_{v_{e1_sn}} \cdot (IRF1_{unstable})_n + k_{inact_i1} \cdot (iIRF1_{stabe})_n - k_{i1unstable_deg} \cdot (IRF1_{unstable})_n$$

When we study this new thesis, we realize that IRF1 mRNA is linear dependent of the number of homodimers in nucleus, and the behaviour is similar to the one expected: a quick increase at the beginning forming a peak after 1 hour in the simulation for homodimers and ~1.5-2 hours for IRF1 mRNA. After this, both decrease (first homodimers and then IRF1) for drawing a curve again, this time with a small increase and decrease leading to a constant value at the end of simulation that can be approximated to 30 molecules of IRF1 mRNA and 4000 molecules of homodimers. About STAT1 mRNA we can say that don't fix neither the shape nor the quantitative value of experimental data. Even though IRF1 proteins fix good to the shape of the expected curve and to the values, although at the beginning of the simulation, itself grows up too much and too fast comparing to the experimental data (Figure 6).

About the phosphorylated STAT1, we can say that the shape of the curve is good, but not too close to the quantitative experimental data, even we could say that has some "retard" on time domain (Figure 7).

The number of STAT1 proteins, we only can say that doesn't fix nor shape neither quantitative value of the experimental data, so this data are not shown in this paper.

IRF1 STABLE AND UNSTABLE PROTEIN MEDIATING STAT1|STAT2

At this moment, we postulate the same in the previous thesis, just changing the mediate protein to active IRF1 protein and make it stable. Now, instead of using STAT1|STAT1 homodimer, we will use STAT1|STAT2 heterodimer.

We do this only to confirm this new hypothesis, by reason of not knowing how it works, and because this heterodimer is involved in a more active manner in this new pathway.

Assuming this premises, we only have to do one change in the model file of the previous thesis, in the equation 17, as a replacement for homodimer, we use the heterodimer:

Equation 17 - IRF1 stable in cytoplasm:

$$\begin{aligned} \frac{d(IRF1_{stable})_c}{dt} = & k_{activ_il} \cdot (STAT1_p | STAT2_p)_c - k_{ildeg} \cdot (IRF1_{stable})_c - i_{il_sn} \cdot (IRF1_{stable})_c \\ & + e_{il_sn} \cdot (IRF1_{stable})_n \end{aligned}$$

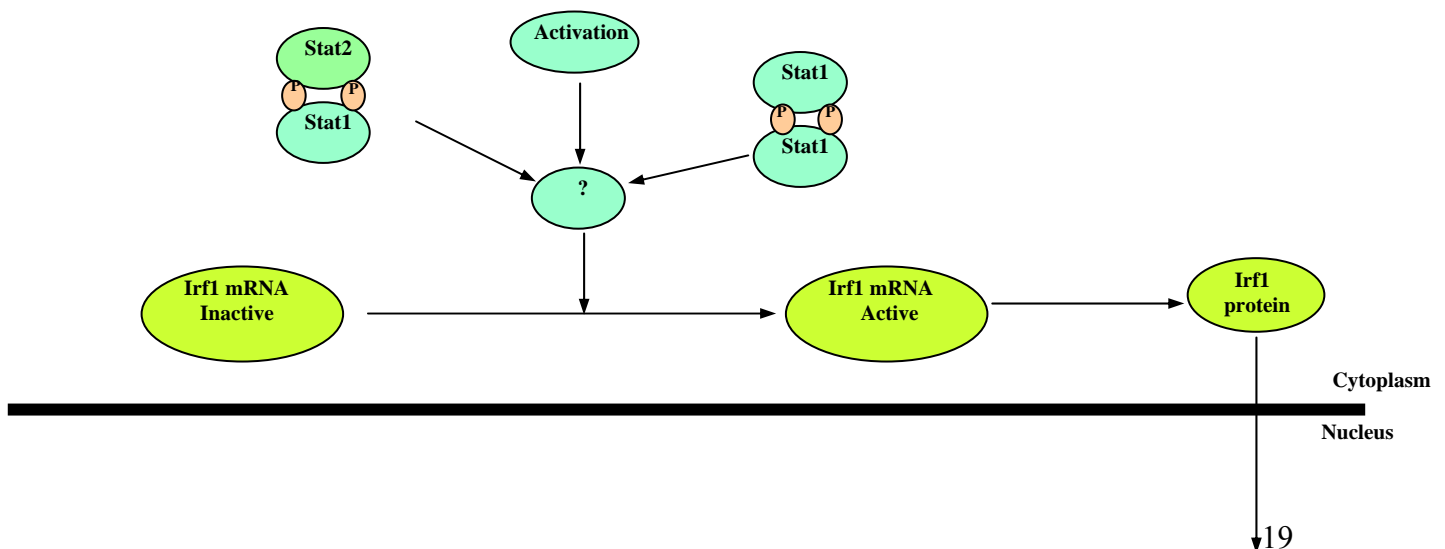
The results we obtain in this case, don't fix to the experimental data in any case, in shape neither in quantitative values. It's because of this that we don't show any explanation or the results we have gotten. So just conclude that this theory works quite well to the cell line in study, only if we use homodimer as activation factor for IRF1 stable (notice that the quantitative values can be fixed better than what is made now).

IRF1 ACTIVE AND INACTIVE TRANSCRIPT

In our last thesis, we postulate that the IRF1 mRNA is created *in novo* in the cytoplasm, but in an inactive molecule. Then, after the action of one unknown factor, that it is thought to be probably STAT1|STAT1 homodimer (but don't discard to be other molecules), IRF1 mRNA inactive becomes active. Finally IRF1 mRNA transcripts the IRF1 protein in the cytoplasm and is imported into the nucleus, where the pathway works in the same way as it was explained before.

The necessary changes made in this case are basically the addition of one more variable to the parameters file, "kilprod", which indicates the constitutive production rate of IRF1 mRNA. It is assumed that the initial number of molecules of this protein is 8, because after the research, is the number that best fix to the experimental data. We have to notice here that in this case we also get rid of PIAS proteins, and we keep a slow creation and phosphorylation rate for STAT1|STAT1 homodimers in nucleus. See also that in this case, one less equation is needed, because with 4 equations the IRF1 pathway is completely described.

The following figure shows how the pathway network changes with this new hypothesis:



IRF1 ACTIVE AND INACTIVE TRANSCRIPT WITH STAT1|STAT1

In this thesis, we presuppose that the activation factor for IRF1 mRNA is the homodimer present in cytoplasm STAT1|STAT1.

We have to change the model file (we suppose that the “kilprod” variable has already been included in the parameters file, and that we have made the changes for make the program run correctly, i.e. how plots are displayed), getting rid of equation number 19 and rewriting equations 15, 16, 17 and 18 as the following:

Equation 15 - IRF1 transcript inactive in cytoplasm:

$$\frac{d(IRF1_{t_inactive})_c}{dt} = k_{i1_prod} - k_{i1deg_t} \cdot (IRF1_{t_inactive})_c + v_{transcription} \cdot (STAT1_p | STAT1_p)_n - k_{activ_i1} \cdot (STAT1_p | STAT1_p)_c \cdot (IRF1_{t_inactive})_c$$

Equation 16 - IRF1 transcript active in cytoplasm:

$$\frac{d(IRF1_{t_active})_c}{dt} = k_{activ_i1} \cdot (STAT1_p | STAT1_p)_c \cdot (IRF1_{t_inactive})_c - k_{i1deg_t} \cdot (IRF1_{t_active})_c$$

Equation 17 - IRF1 protein in cytoplasm:

$$\frac{d(IRF1_{protein})_c}{dt} = translation_blocking \cdot k_{transl} \cdot (IRF1_{t_active})_c - k_{i1deg} \cdot (IRF1_{protein})_c - i_{i1_pn} \cdot (IRF1_{protein})_c + e_{i1_pn} \cdot (IRF1_{protein})_n$$

Equation 18 - IRF1 protein in nucleus:

$$\begin{aligned} \frac{d(IRF1_{protein})_n}{dt} = & k_{i_{il_pc}} \cdot (IRF1_{protein})_c - k_{e_{il_pn}} \cdot (IRF1_{protein})_n - k_{i_{deg}} \cdot (IRF1_{protein})_n \\ & - k_{s_{li1}} \cdot (IRF1_{protein})_n \cdot (STAT1)_n - k_{inv_s_{li1}} \cdot (IRF1_{protein} | STAT1)_n \end{aligned}$$

When running this simulation we can see that IRF mRNA and IRF protein in nucleus, both work quite well, the shape of the curve fixes good to the experimental data, first a high peak (~58 molecules) when 2 hours of simulation has passed, then a decrease until reach ~25 molecules, and then, grows up a little to reach at the end of simulation the constant value of ~23 molecules (we have to know that is very difficult that the experimental data and the simulation curve fix extremely well, because the experimental data is just that, data taken of a single cell in an circumstantial moment). So the curve for STAT homodimers in nucleus also behaves as it was expected, same shape just a little before in time, reaching the amount of ~14000 molecules in the peak and leading to the constant rate of ~2000 molecules at the end of simulation (Figure 8).

Nevertheless, STAT1 mRNA and the total count of STAT1 proteins don't work as the proper manner, at least, at they were supposed to. Surprisingly, the simulation give us not so bad results when talking about phosphorylated STAT1, but it is thought that, even being better than other hypotheses, are not good enough for this study. It's because of this that the results of all these data are not shown here.

IRF1 ACTIVE AND INACTIVE TRANSCRIPT WITH STAT1|STAT2

The current hypothesis is just the same as the one before. The main difference lies in the complex used as activation factor, in this case we are working with the heterodimer STAT1|STAT2. It is thought that this won't work better than using the homodimer, but it is necessary to check if this is true or not, because in a research like this we cannot set any hypothesis as wrong as far as we haven't checked it.

Due to this, we make the changes needed, which, in fact, only consist in change the equations 15 and 16 from the previous thesis in the following way:

Equation 15 - IRF1 transcript inactive in cytoplasm:

$$\frac{d(IRF1_{t_inactive})_c}{dt} = k_{i1_prod} - k_{i1_deg_t} \cdot (IRF1_{t_inactive})_c + v_{transcription} \cdot (STAT1_p | STAT2_p)_n - k_{activ_i1} \cdot (STAT1_p | STAT1_p)_c \cdot (IRF1_{t_inactive})_c$$

Equation 16 - IRF1 transcript active in cytoplasm:

$$\frac{d(IRF1_{t_active})_c}{dt} = k_{activ_i1} \cdot (STAT1_p | STAT2_p)_c \cdot (IRF1_{t_inactive})_c - k_{i1_deg_t} \cdot (IRF1_{t_active})_c$$

After the simulation, we can see that the results obtained are what we were expecting, all the molecules and complexes in the simulation doesn't fit to the experimental data, nor in shape, neither in quantitative value, so it's needless showing or explaining these results, because it wouldn't make any sense.

IRF1 ACTIVE AND INACTIVE TRANSCRIPT WITH ACTIVATION

In this last part of this study, we will check the same hypothesis, but with one small change. Instead of using any molecule or complex as an activator factor, we will see if this theory works just using the activation factor included inside the IRF1 inactive mRNA. This means that we suppose now that the IRF1 mRNA inactive changes into active by itself. There is no need of other molecules or complexes to help IRF1 mRNA to become active. Thus, the model file only will change in equations 15 and 16, as the case before the current one, setting this file in the following way:

Equation 15 - IRF1 transcript inactive in cytoplasm:

$$\frac{d(IRF1_{t_inactive})_c}{dt} = k_{i1_prod} - k_{i1_deg_t} \cdot (IRF1_{t_inactive})_c + v_{transcription} \cdot (STAT1_p \mid STAT2_p)_n - k_{activ_i1} \cdot (IRF1_{t_inactive})_c$$

Equation 16 - IRF1 transcript active in cytoplasm:

$$\frac{d(IRF1_{t_active})_c}{dt} = k_{activ_i1} \cdot (IRF1_{t_inactive})_c - k_{i1_deg_t} \cdot (IRF1_{t_active})_c$$

Seen that the results obtained are similar to the ones we got using STAT1|STAT2 heterodimer as the activation factor (at least, as bad as the other ones), we won't show neither explain them.

So the conclusion we get regarding to this hypothesis about IRF1 mRNA active and inactive in cytoplasm, we can say that it works using STAT1|STAT1 homodimer as activation factor, but we must go on with the research, due to we did not get any favourable results.

CONCLUSIONS

The last conclusion we deduce is that once we've done all simulations for the corresponding hypothesis, concerning IFN- β signalling pathway, the premise that fits better to experimental data, the closest to biochemistry true, is the one about mRNA IRF1 may be presented in two different ways: active and inactive form mediating STAT1|STAT1 homodimer in cytoplasm action as activation factor. Nevertheless, obtained data are not good enough to confirm signalling pathway works this way, at least not with A549 cell line. So, we assert research should go on in this way, the active and inactive mRNA IRF1 factor in cytoplasm, in spite of the results we got are not the best possible, but with this work, we have delimited research lines to this one.

TRANSLATION INTO SPANISH

INTRODUCCIÓN

Los mecanismos de señalización del Interferón- β inducido por JAK-STAT contribuyen al reconocimiento de la mucosa del sistema inmune y llevan al organismo hacia un estado anti-vírico. Aunque los principales mecanismos moleculares que constituyen estos caminos son conocidos, ni la estructura detallada de la “red reguladora”, ni su dinámica han sido estudiadas a fondo aún. El objetivo de este trabajo es crear un modelo matemático para la fase de activación del camino “JAK-STAT” que serviría para dos procesos principales:

- 1) Reproducir datos experimentales en simulaciones en la respuesta tanto temprana como tardía a la estimulación con Interferón- β .
- 2) Explicar los fenómenos experimentales, generando nuevas hipótesis sobre los mecanismos de regulación que aún no han sido probados empíricamente.

Los cambios temporales determinados experimentalmente en la mayoría de los componentes de este camino fueron usados para construir un modelo matemático que describe la dinámica de dicho camino usando ecuaciones diferenciales ordinarias. El modelo reproducía dos distintas fases de la respuesta inmune –una respuesta temprana que resulta de la producción de IRF1 a través de la molécula denominada Tyr-fosforilado STAT1 DNA-fijador de complejos, y una respuesta tardía mediante la síntesis de nuevo IRF1 controlando la expresión de las proteínas STAT1, LMP2 y TAP1.

Estos datos muestran que el camino de “JAK-STAT” epitelial está sujeto a una serie de nuevos mecanismos de control dinámico negativo. El modelo matemático mostrado aquí ha demostrado ser una herramienta muy útil en la investigación de vías reguladoras, no sólo para reproducir datos empíricos, sino ayudando también a formular nuevas hipótesis sobre los procesos que controlan dichos caminos [1].

ANTECEDENTES

La respuesta inmune innata es una “primera línea de defensa” que sirve para proteger al individuo ante infecciones mediante la rápida puesta en marcha de unos procesos de señalización que se activan cuando se reconoce cierto patrón perteneciente a un organismo patógeno [2]. En el caso de infecciones víricas, la superficie celular y los TLR endosomáticos (receptores de reconocimiento de patrones de ADN vírico y bacteriano, situados en el sistema membranoso celular encargado de la digestión celular) o las helicasas intracelulares RIG-I/MDA-5 (receptores de RNA sintético (dsRNA) y viral), notan la presencia de dsRNA intermedios, y regulan ascendentemente los mecanismos de señalización resultantes de la expresión mejorada de citoquinas que se usan como limitadores de la propagación viral. Esto ocurre en primer en primer término en lo que a respuesta inmune se refiere. Este proceso se desarrolla hasta que la respuesta inmune adaptativa termina de perfeccionarse [3]. De estas citoquinas producidas, los interferones altamente inducidos (IFNs) son un pilar central en la respuesta inmune innata (temprana).

Existen tres tipos de IFN expresados cada uno en diferentes células, con papeles distintos en la respuesta inmune y con diferentes vías de señalización. En el presente estudio, nos centraremos en una isoforma del IFN Tipo I, el IFN- β . Esto, producido fundamentalmente en células epiteliales, constituye una primera línea de contacto importante entre el espacio intracelular y los virus invasores [4]. Es fuertemente inducido por infecciones víricas y funciona de una forma paracrina (tipo de comunicación intercelular local, que no hace uso de estructuras especializadas como la sinapsis) para limitar la replicación vírica.

Después de esto, trabajaremos en el modelo dinámico de los mecanismos de señalización de IFN Tipo-I usando ecuaciones diferenciales ordinarias (ODEs).

MODELO DE PARTIDA

El IFN- β activa sus receptores resultando en la fosforilación de las proteínas STAT1 y STAT2. Posteriormente, un número de homodímeros STAT1 (entre otros) son formados, induciendo la transcripción IRF1. En el núcleo, las moléculas del grupo STAT son defosforiladas, los complejos de los que forma parte son disociados y las moléculas STAT defosforiladas son esportadas del núcleo. Las moléculas IRF1 sintetizadas recientemente son transportadas al núcleo, donde posteriormente controla la expresión tardía de genes, incluyendo TAP-1/LMP-2 y STAT1. Los procesos que llevan a la expresión temprana de genes (o más específicamente, el gen temprano IRF1) serán nombrados a partir de ahora como *sistema de respuesta temprana*. El término *Sistema de respuesta tardía* es usada para describir todos los eventos que ocurren después de que el gen IRF1 haya sido transcrito, incluyendo su traducción, activación, transporte al núcleo, formación de complejos, expresión de los genes STAT1, LMP2 y TAP1, y finalmente, la acumulación de IRF1 en el citoplasma.

Debido a la complejidad de los mecanismos de señalización y su entrecruzamiento, este análisis se ha acotado sólo a los procesos más importantes. Siete procesos básicos han sido usados en la formulación del modelo: formación y disociación de complejos proteicos, fosforilación y defosforilación de moléculas, transcripción de genes, traducción de mRNA (RNA mensajero) y degradación de moléculas. La figura siguiente detalla el diseño de la ruta modelada:

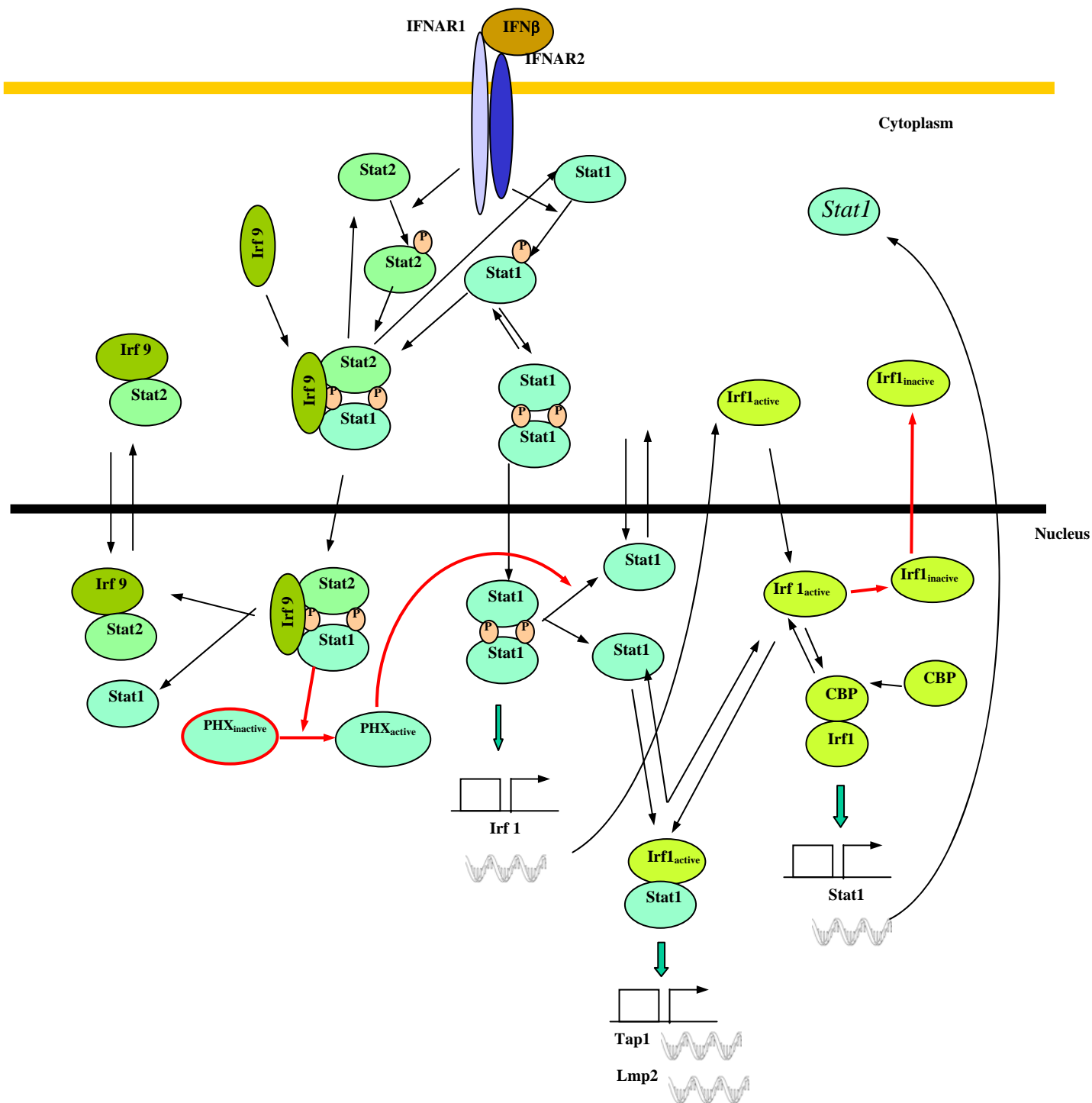


Figura 1: Mecanismo de señalización IFN

El conjunto de ecuaciones diferenciales (ODEs) que rigen el comportamiento dinámico de los mecanismos de señalización se presentan y explican brevemente seguidamente, pero antes es necesario precisar la notación usada en la formulación de dicho conjunto:

- Los nombres de las variables corresponden a proteínas y los complejos y transcripciones que representan; para mayor claridad se han notado entre paréntesis.
- Las variables denotan concentraciones molares citoplasmáticas si no van acompañadas de ningún subíndice. En caso de que aparezca una variable acompañada del subíndice n , se refiere a concentración nuclear.
- La concentración de transcripciones mRNA es denotado por el subíndice t y siempre se refiere a concentraciones citoplasmáticas; se asume que el proceso de transporte de mRNA hacia el citoplasma es muy rápido, por lo que despreciable, frente a otros procesos, incluso los que no están incluidos en este modelo.
- La forma *fosforilada* de las proteínas se denotan por el subíndice p .
- Los subíndices *active* e *inactive* son usados para distinguir cada uno de estos estados moleculares respectivamente.
- *Activation* es una variable binaria que toma el valor 1 cuando hay un proceso de estimulación de IFN y 0 en caso contrario.
- $k_v = V/U$; ésta es la fórmula empleada para calcular la proporción entre los volúmenes citoplasmático y nuclear, respectivamente.

Proteínas libres STAT1 y STAT2 en el citoplasma:

$$\begin{aligned} \frac{d(STAT1)}{dt} = & k_{transl} \cdot (STAT1_t) - k_{s1deg} \cdot (STAT1) - i_{s1} \cdot (STAT1) + e_{s1} \cdot (STAT1)_n \\ & - Activation \cdot \frac{k_{s1_phos} \cdot (STAT1)}{1 + k_{s1_phos_sat} \cdot (STAT1)} + k_{s1_deph} \cdot (STAT1_p) \\ & + 2k_{inv_s1s1} \cdot (STAT1_p | STAT1_p) + k_{inv_s1s2} \cdot (STAT1_p | STAT2_p) \end{aligned} \quad (1)$$

$$\begin{aligned} \frac{d(STAT2)}{dt} = & k_{transl} \cdot (STAT2_t) - k_{s2deg} \cdot (STAT2) - i_{s2} \cdot (STAT2) + e_{s2} \cdot (STAT2)_n \\ & - Activation \cdot \frac{k_{s2_phos} \cdot (STAT2)}{1 + k_{s2_phos_sat} \cdot (STAT2)} + k_{s2_deph} \cdot (STAT2_p) \\ & + k_{inv_s1s2} \cdot (STAT1_p | STAT2_p) \end{aligned} \quad (2)$$

Proteínas libres STAT1 y STAT2 en el núcleo:

$$\begin{aligned} \frac{d(STAT1)_n}{dt} = & -k_{s1deg} \cdot (STAT1)_n + k_v i_{s1} \cdot (STAT1) - k_v e_{s1} \cdot (STAT1)_n \\ & + 2k_{inv_s1s1_n} \cdot (STAT1_p | STAT1_p)_n + k_{inv_s1s2_n} \cdot (STAT1_p | STAT2_p)_n \\ & - k_{s1il} \cdot (STAT1)_n \cdot (IRF1_{active})_n + k_{inv_s1il} \cdot (STAT1 | IRF1)_n \\ & + 2 \cdot k_{inv_xs1s1} \cdot (PHX | STAT1_p | STAT1_p)_n \end{aligned} \quad (3)$$

$$\begin{aligned} \frac{d(STAT2)_n}{dt} = & -k_{s2deg} \cdot (STAT2)_n + k_v i_{s2} \cdot (STAT2) - k_v e_{s2} \cdot (STAT2)_n \\ & + k_{inv_s1s2_n} \cdot (STAT1_p | STAT2_p)_n \end{aligned} \quad (4)$$

Proteínas libres STATs fosforiladas en el citoplasma:

$$\begin{aligned} \frac{d(STAT1_p)}{dt} = & -k_{s1pdeg} \cdot (STAT1_p) \\ & + Activation \cdot \frac{k_{s1_phos} \cdot (STAT1)}{1 + k_{s1_phos_sat} \cdot (STAT1)} - k_{s1_deph} \cdot (STAT1_p) \\ & - 2k_{s1s1} \cdot (STAT1_p) \cdot (STAT1_p) - k_{s1s2} \cdot (STAT1_p) \cdot (STAT2_p) \end{aligned} \quad (5)$$

$$\begin{aligned}
\frac{d(STAT2_p)}{dt} = & -k_{s2 \text{ deg}} \cdot (STAT2_p) \\
& + Activation \cdot \frac{k_{s2_phos} \cdot (STAT2)}{1 + k_{s2_phos_sat} \cdot (STAT2)} - k_{s2_deph} \cdot (STAT2_p) \\
& - k_{s1s2} \cdot (STAT1_p) \cdot (STAT2_p)
\end{aligned} \tag{6}$$

Complejos STAT1 fosforilados:

$$\begin{aligned}
\frac{d(STAT1_p | STAT1_p)}{dt} = & k_{s1s1} \cdot (STAT1_p) \cdot (STAT1_p) - k_{inv_s1s1} \cdot (STAT1_p | STAT1_p) \\
& - i_{s1s1} \cdot (STAT1_p | STAT1_p)
\end{aligned} \tag{7}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d(STAT1_p | STAT2_p)}{dt} = & k_{s1s2} \cdot (STAT1_p) \cdot (STAT2_p) - k_{inv_s1s2} \cdot (STAT1_p | STAT2_p) \\
& - i_{s1s1} \cdot (STAT1_p | STAT2_p)
\end{aligned} \tag{8}$$

La dinámica en el núcleo viene dada por:

$$\begin{aligned}
\frac{d(STAT1_p | STAT1_p)_n}{dt} = & -k_{inv_s1s1_n} \cdot (STAT1_p | STAT1_p)_n + k_v i_{s1s1} \cdot (STAT1_p | STAT1_p) \\
& - k_{xs1s1} \cdot (STAT1_p | STAT1_p)_n \cdot (PHX_{active})_n
\end{aligned} \tag{9}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d(STAT1_p | STAT2_p)_n}{dt} = & -k_{inv_s1s2_n} \cdot (STAT1_p | STAT2_p)_n + k_v i_{s1s1} \cdot (STAT1_p | STAT2_p)
\end{aligned} \tag{10}$$

Fosfatasa PHX libre, active e inactiva

De acuerdo al modelo que asumimos como válido, esta fosfatasa se encuentra en el núcleo.

$$\frac{d(PHX_{inactive})_n}{dt} = -k_{activ} \cdot (PHX_{inactive})_n \cdot (STAT1_p | STAT2_p)_n \quad (11)$$

$$\begin{aligned} \frac{d(PHX_{active})_n}{dt} = & k_{activ} \cdot (PHX_{inactive})_n \cdot (STAT1_p | STAT2_p)_n \\ & - k_{xs1s1}(STAT1_p | STAT1_p)_n \cdot (PHX_{active})_n + k_{inv_xs1s1}(PHX | STAT1_p | STAT1_p)_n \end{aligned} \quad (12)$$

Compuesto PHX/STAT1/STAT1

$$\begin{aligned} \frac{d(PHX | STAT1 | STAT1)_n}{dt} = & \\ = & k_{xs1s1} \cdot (STAT1_p | STAT1_p)_n \cdot (PHX_{active}) - k_{inv_xs1s1} \cdot (PHX | STAT1_p | STAT1_p)_n \end{aligned} \quad (13)$$

Proteína IRF1 libre en el citoplasma y núcleo:

$$\begin{aligned} \frac{d(IRF1_{active})}{dt} = & k_{transl} \cdot (IRF1_t) - k_{i1deg} \cdot (IRF1_{active}) \\ & - i_{i1} \cdot (IRF1_{active}) + e_{i1} \cdot (IRF1_{active})_n \end{aligned} \quad (14)$$

$$\begin{aligned} \frac{d(IRF1_{active})_n}{dt} = & -k_{i1deg} \cdot (IRF1_{active})_n - k_{inact_i1} \cdot (IRF1_{active})_n \\ & + k_v i_{i1} \cdot (IRF1_{active}) - k_v e_{i1} \cdot (IRF1_{active})_n \\ & - k_{s1i1} \cdot (IRF1_{active})_n \cdot (STAT1)_n + k_{inv_s1i1} \cdot (IRF1 | STAT1)_n \end{aligned} \quad (15)$$

$$\frac{d(IRF1_{inactive})_n}{dt} = k_{inact_i1} \cdot (IRF1_{active})_n - k_{i1deg} \cdot (IRF1_{inactive})_n - k_v e_{i1_in} \cdot (IRF1_{inactive})_n \quad (16)$$

$$\frac{d(IRF1_{inactive})}{dt} = -k_{ildeg} \cdot (IRF1_{inactive}) + e_{il_in} \cdot (IRF1_{inactive})_n \quad (17)$$

Compuesto $IRF1/STAT1$ en el núcleo:

$$\begin{aligned} \frac{d(IRF1|STAT1)_n}{dt} = & k_{slil} \cdot (IRF1_{active})_n \cdot (STAT1)_n - k_{inv_slil} \cdot (IRF1|STAT1)_n \\ & - k_{slil_deg} \cdot (IRF1|STAT1)_n \end{aligned} \quad (18)$$

mRNA de $IRF1$, $STAT1$, $TAP1$ y $LMP2$

$$\frac{d(IRF1_t)}{dt} = k_{iltprod} + v_{ilt} \cdot (STAT1_p | STAT1_p)_n - k_{ilt_deg} \cdot (IRF1_t) \quad (19)$$

$$\frac{d(TAP1_t)}{dt} = k_{t1tprod} + v_{t1t} \cdot (IRF1|STAT1)_n - k_{t1t_deg} \cdot (TAP1_t) \quad (20)$$

$$\frac{d(LMP2_t)}{dt} = k_{l2tprod} + v_{l2t} \cdot (IRF1|STAT1)_n - k_{l2t_deg} \cdot (LMP2_t) \quad (21)$$

$$\frac{d(STAT1_t)}{dt} = k_{s1tprod} + v_{s1t} \cdot (TF_{s1})_n - k_{s1t_deg} \cdot (STAT1_t) \quad (22)$$

$$\frac{d(STAT2_t)}{dt} = k_{s2tprod} - k_{s2t_deg} \cdot (STAT2_t) \quad (23)$$

Variable adicional $(TF_{sI})_n$

Para calcular $(TF_{sI})_n$ en (22), la ecuación es:

$$\frac{dy_i}{dt} = -\frac{1}{T} \cdot y_i + \frac{1}{T} \cdot y_{i-1}, \quad (24)$$

Donde $y_0 = (IRF1)_n$, $i = 1, 2, 3, 4$, y $(TF_{sI})_n = y_4$.

Estas ecuaciones han sido diseñadas para solucionar el problema de modelado del mecanismo de señalización que ilustra la figura 1, la cual, fue proporcionada por los colaboradores del presente proyecto en la universidad de Houston, Texas, EEUU. De esta manera, tendremos un sistema con un conjunto de funciones, que tomarán los valores de las variables desde otro fichero, que almacenará los datos de los estudios clínicos, dando como resultado una serie de gráficos mostrando la información correspondiente a las concentraciones de las moléculas que intervienen en el proceso de respuesta inmune que nos ocupa. Los resultados extraídos de este primer modelo no son mostrados aquí, ya que esto no es el objetivo del presente estudio. Simplemente mencionar lo útil que resultan los modelos matemáticos para entender procesos biológicos y químicos. En este caso, 2 nuevos mecanismos fueron descubiertos: la regulación en la expresión de genes tempranos, consistente en la regulación del nivel de homodímeros STAT1, y el control de las respuestas tardías del sistema a través de la acumulación de IRF1 en el citoplasma. Y además, ahora somos capaces de comprender algo mejor los exhaustivos datos experimentales mostrados en células estimuladas con IFN- β , tanto el sistema de regulación temprano como el tardío. Por tanto, lo que tendremos tras haber diseñado nuestro modelo es un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias que reciben unos datos medidos a lo largo de un periodo de tiempo (24 horas) que generan una serie de gráficos mostrando la evolución de la concentración de distintas moléculas a lo largo del tiempo de simulación. Lo que nos interesa en este estudio, es precisamente la forma de esta gráfica, los datos cualitativos, no los cuantitativos, ya que lo que nos interesa es cómo evolucionan las moléculas a lo largo del camino de señalización y comprender de ésta manera cómo funciona la respuesta inmune temprana y tardía en células estimuladas con IFN- β .

ADAPTACIÓN DEL MODELO A UNA NUEVA LÍNEA CELULAR

El modelo propuesto anteriormente fue desarrollado de manera que sirviera como modelo genérico de lo que ocurre en el interior de una célula cualquiera cuando es estimulada con IFN- β . La siguiente parte del estudio está centrada en adaptar dicho modelo a una línea celular específica, las células epiteliales A549, una línea celular que consiste en un conjunto de células epiteliales pulmonares cancerosas. Lo descrito a continuación son los intentos de cambiar el modelo creado anteriormente con la ayuda de ciertas hipótesis que nos formulamos para poder adaptar los resultados del modelo a los experimentales, y de esta manera, rediseñar los procesos de señalización. Este es el propósito real del estudio, comprobar si las nuevas hipótesis que nos formulamos son válidas para esta línea celular en concreto e incluso para otras aún no estudiadas.

Nótese que el siguiente trabajo hecho después de la construcción del modelo matemático ha sido comprobar si los datos experimentales de la línea celular A549, incluyendo la concentración nuclear y citoplasmática de IRF1 y STAT1 (fosforilado y defosforilado) están en consonancia con la simulación que realizamos con nuestro modelo. También se han medido los niveles de IRF1, STAT1, LMP2 y TAP1 mRNA. Es necesario observar también que no disponemos de datos experimentales para la concentración de homodímeros de STAT1 en el núcleo, por lo que no podemos comparar esta magnitud con los resultados obtenidos de las simulaciones. Por consiguiente, pasaremos a explicar todas las hipótesis formuladas que creemos biológicamente plausibles para adaptar el modelo a la nueva línea celular, y así, por medio de la comparación de los gráficos generados en las simulaciones con los de los datos experimentales, obtener un mecanismo de señalización más preciso y concreto al objeto de nuestro estudio, la línea celular A549.

OMISIÓN DEL COMPUESTO PIAS

La primera suposición que vamos a manejar es la de omitir el compuesto PIAS en nuestro modelo. Este compuesto es necesario para el proceso de traducción de IRF1, mediante el homodímero STAT1|STAT1 en el núcleo. Pensamos que el mecanismo que implica esta acción, y la posterior disociación del homodímero puede ser posible sin la ayuda del compuesto PIAS, o tal vez, que sea posible gracias a la intervención de otra proteína. Incluso si realmente el compuesto PIAS es el involucrado, tal vez su presencia pueda ser despreciada para el caso que nos ocupa.

El cambio hecho consiste simplemente en poner a 0 la variable “kpiass1s1”, que almacena el valor de la tasa de creación del compuesto formado por la proteína PIAS y el homodímero STAT1|STAT1. Esta variable la encontramos en el fichero de parámetros, en la sección de tasas de creación de compuestos. Haciendo esto, nos aseguramos que al comienzo de la simulación no hay ningún compuesto de este tipo. Este compuesto no es usado en ningún otro momento del mecanismo de señalización, por lo que simplemente negamos la participación activa de esta proteína en nuestro modelo.

Los resultados obtenidos suponen que hay una relación lineal directa entre el número de moléculas fosforiladas de STAT1 tanto en el citoplasma como en el núcleo. En ambos casos, nos damos cuenta que hay un pico en la gráfica de concentración precedida de un muy veloz incremento del número de moléculas tras las 2 primeras horas de simulación. Entonces el número de moléculas se estabiliza (70000 moléculas en el núcleo y 2500 en el citoplasma aproximadamente). El número total de proteínas STAT1 es proporcional también en el núcleo y citoplasma, creciendo aun tras 5 horas de simulación (Figura 1).

A pesar del IRF1 mRNA y su relación con los homodímeros STAT1, no podemos asegurar que omitir las proteínas PIAS de nuestro modelo sea una buena opción, debido a que la observación de ambos parámetros, en este caso, no tienen relación entre ellos o con

los datos experimentales (con los que comparamos los datos obtenidos de la simulación de nuestro modelo). Este es un punto importante que no podemos obviar, por lo que nuestra conclusión ante este primer intento es que no podemos eliminar de nuestro modelo las proteínas PIAS (Figura 2).

TASA DE CREACIÓN DEL COMPUESTO PIAS BAJA

El siguiente paso de nuestro estudio tras haber testado que nuestra anterior hipótesis no era válida (obviando el compuesto PIAS nuestra simulación no se adaptaba a los datos experimentales), es el de reducir la tasa de creación de este compuesto (que forma parte del compuesto PIAS|STAT1|STAT1) en vez de tener una cantidad nula de la proteína PIAS. Por tanto el siguiente cambio que realizaremos en nuestro modelo inicial es simplemente cambiar el valor inicial de la tasa de creación de PIAS, que es al principio de 0,7 l/uM*s. Vamos cambiando el valor de esta variable, y haciendo las simulaciones oportunas, de manera que concluimos que el cambio que mejor se adapta a los datos experimentales es el que sitúa la tasa de creación inicial de la proteína PIAS a 0,2 l/uM*s.

Teniendo en cuenta la forma de los gráficos que muestran la concentración de los homodímeros STAT1 en el núcleo y IRF1 mRNA de nuestro procedimiento, podemos asegurar que estas dos variables son linealmente dependientes, de ahí la conclusión que extraemos es que STAT1 es el factor de transcripción para el IRF1 mRNA, la forma de ambas gráficas son similares, a pesar de que el gráfico de los homodímeros STAT1 en el núcleo crece muy rápidamente, formando un pico máximo a la hora 1 de la simulación, mientras que el IRF1 mRNA lo forma a la hora 2,5. Sin embargo, nuestra simulación no se ajusta lo preciso a los datos experimentales. La proteína IRF1 y la STAT mRNA también están relacionadas: primero la concentración de proteína IRF1 aumenta debido a que es sintetizada primero en el bucle positivo, tras algún tiempo, el nivel de la proteína STAT aumenta también debido al bucle de retroalimentación negativa, y, entonces, ambas concentraciones decrecen hacia un valor constante (Figura 3).

Respecto a la proteína STAT1 forforilada, los valores no se ajustan a los datos cuantitativos, pero respecto a la forma de los gráficos, que no son precisamente buenos, se aproximan bastante a lo que esperábamos, un crecimiento rápido inicial, alcanzando un

máximo al comienzo de la simulación seguido de un decrecimiento hasta alcanzar un valor constante (aproximadamente 40000 moléculas en el núcleo y unas 2500 en el citoplasma). Respecto a la proteína STAT1, sólo podemos asegurar que crece hacia un valor constante que no podemos precisar aún (Figura 4).

SIN COMPUESTO PIAS Y TASA DE CREACIÓN DE HOMODÍMEROS BAJA

La próxima cuestión que se nos plantea es resolver qué pasa si despreciamos la presencia de proteínas PIAS en nuestro modelo y hay un descenso en las tasas de creación y fosforilación de los homodímeros STAT1|STAT1.

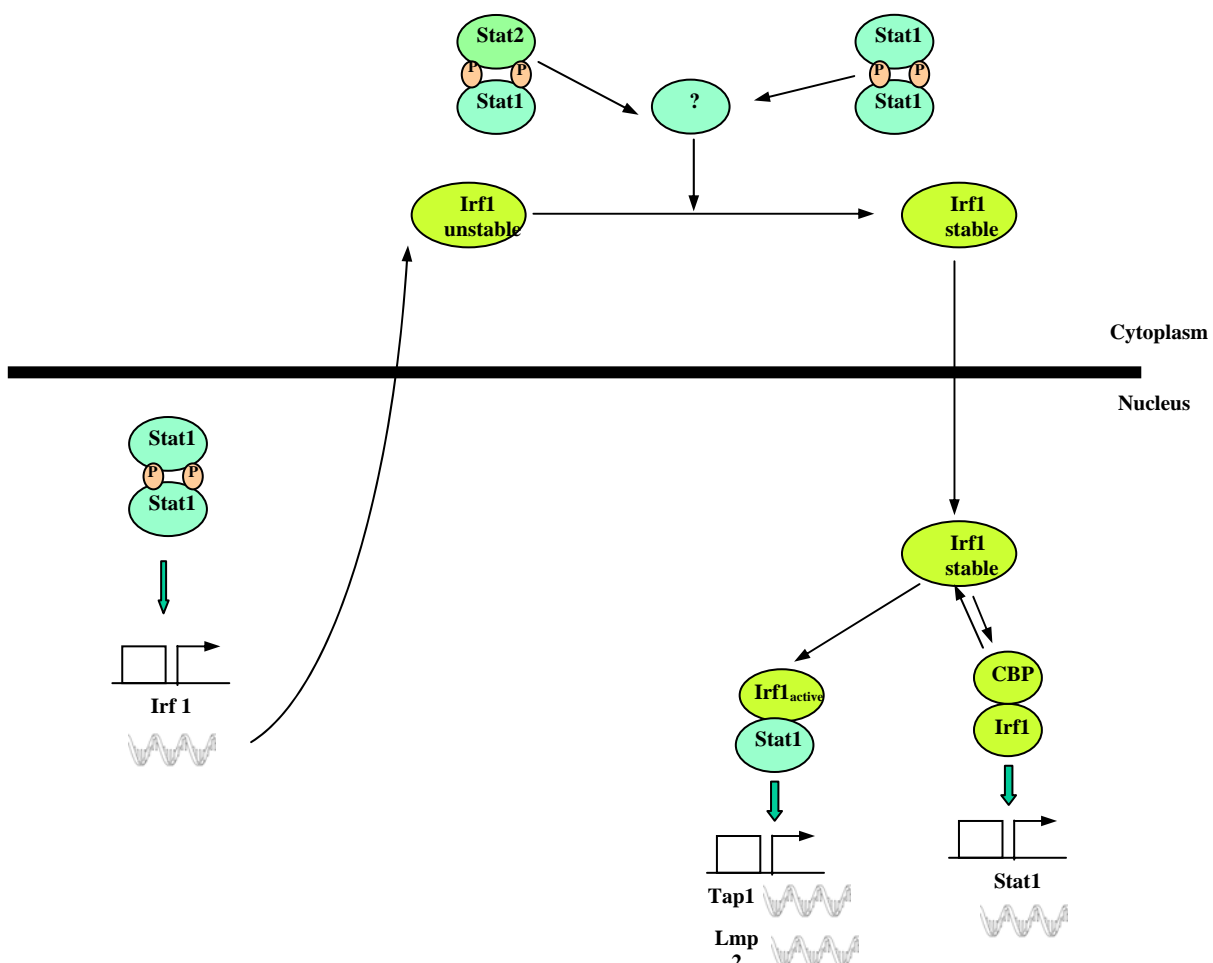
No se ha advertido ningún cambio reduciendo la tasa de creación de estas proteínas (resultado nos mostrados en este estudio). Dada esta apreciación, nos centraremos entonces en establecer a 0 la variable del compuesto formado por el homodímero STAT1 y la proteína PIAS. Entonces, para reducir la tasa de fosforilación de los homodímeros STAT1 en el núcleo, no hay sentido sólo tenemos que incrementar el valor de la variable correspondiente al tiempo medio para homodímeros en el núcleo; ya que no tiene sentido hacer esto para los homodímeros del citoplasma, debido a que en lo que realmente estamos interesados es en fijar los procesos relacionados con el IRF1 mRNA, el bucle de retroalimentación negativa.

En este caso, como se puede ver, los homodímeros STAT1 y el compuesto IFR1 mRNA son linealmente independientes, y que el primero está envuelto en el proceso de creación del segundo. Los resultados para IFR1 mRNA son mejores, debido a que la forma de los gráficos de las simulaciones es en lo único en que nos fijamos: primero hay un crecimiento de concentración, hasta que se alcanza un pico máximo, es entonces cuando comienza a disminuir lentamente, para continuar con un pequeño incremento constante hacia un valor acotado; aunque de nuevo, la simulación no se ajusta lo suficiente a los datos experimentales (Figura 5).

El resto de los parámetros cuya medición nos interesa están siendo omitidos en este resumen debido a que no muestran datos relevantes para lo que nos atañe actualmente.

PROTEÍNA IRF1 ESTABLE E INESTABLE

En esta sección postulamos una nueva hipótesis sobre el mecanismo de señalización de la proteína IRF1. Asumimos ahora, que como antes, el IRF1 mRNA es un producto de transcripción mediante el homodímero STAT1|STAT1 en el núcleo. Entonces, este IRF1 mRNA es exportado desde el núcleo al citoplasma, como una forma INESTABLE de la proteína IRF1. Esta proteína, en el citoplasma, cambia de estado y se vuelve ESTABLE por la acción de un factor desconocido: el homodímero STAT1|STAT1 o el heterodímero STAT1|STAT2. Después de que esto ha ocurrido, la proteína estable es importado de nuevo al núcleo, donde actúa como se ha explicado anteriormente: formando compuestos con las moléculas STAT1 y con moléculas CBP para la transcripción de las proteínas STAT1. A continuación se explica con un gráfico la tesis propuesta:



PROTEÍNA IRF1 ESTABLE E INESTABLE MEDIANTE STAT1|STAT1

Seguidamente vamos a aplicar la tesis usando el homodímero STAT1|STAT1 como el factor de activación presente en el citoplasma que hace que la proteína IRF1 cambie a un estado “estable”. Para hacer esto, mantendremos en nuestro modelo la baja tasa de fosforilación de homodímeros en el núcleo y obviaremos la acción de las proteínas PIAS, tesis anteriormente probadas. Los cambios que realizaremos en el conjunto de ecuaciones de nuestro modelo serán realizados sobre cada una de las ecuaciones que se refieren a la vía señalizada de IRF1, salvo la ecuación número 15, debido a que ésta ecuación se refiere a la transcripción de IRF mRNA dependiente de la concentración de homodímeros. Por tanto, en nuestro conjunto de ODE's, cambiaremos las ecuaciones número 16, 17, 18 y 19 de la siguiente manera:

Ecuación 16 – IRF1 inestable en el citoplasma:

$$\frac{d(IRF1_{unstable})_c}{dt} = k_{translation_il} \cdot (IRF1_{transcript})_n - k_{il\ deg} \cdot (IRF1_{unstable})_c + e_{il_un} \cdot (IRF1_{unstable})_c - i_{il_un} \cdot (IRF1_{unstable})_n$$

Ecuación 17 – IRF1 estable en el citoplasma:

$$\frac{d(IRF1_{stable})_c}{dt} = k_{activ_il} \cdot (STAT1_p | STAT1_p)_c - k_{il\ deg} \cdot (IRF1_{stable})_c - i_{il_sn} \cdot (IRF1_{stable})_c + e_{il_sn} \cdot (IRF1_{stable})_n$$

Ecuación 18 – IRF1 estable en el núcleo:

$$\frac{d(IRF1_{stable})_n}{dt} = k_v i_{il_sc} \cdot (IRF1_{stable})_c - k_v e_{il_sn} \cdot (IRF1_{stable})_n - k_{il_deg} \cdot (IRF1_{stable})_n - k_{inact_il} \cdot (IRF1_{stable})_n - k_{sil} \cdot (IRF1_{stable} | STAT1)_n + k_{sil_deg} \cdot (IRF1_{stable} | STAT1)_n$$

Ecuación 19 – IRF1 inestable en el núcleo:

$$\frac{d(IRF1_{unstable})_n}{dt} = k_v i_{il_sc} \cdot (IRF1_{unstable})_n - k_v e_{il_sn} \cdot (IRF1_{unstable})_n + k_{inact_il} \cdot (iIRF1_{stable})_n - k_{ilunstable_deg} \cdot (IRF1_{unstable})_n$$

Cuando estudiamos esta nueva hipótesis, descubrimos que el IRF1 mRNA es linealmente dependiente de la concentración de homodímeros en el núcleo, y su comportamiento es parecido al que esperábamos: un rápido incremento al comienzo, formando un máximo en la hora 1 de la simulación para los homodímeros y otro en la hora 1.5 en el caso de IRF1-mRNA. Después de esto, la concentración de ambas moléculas desciende, para dibujar de nuevo una curva, compuesta esta vez por un pequeño aumento en la concentración seguido de un descenso leve que se estabiliza hacia una cantidad constante al final de la simulación (aproximadamente 30 moléculas de IRF1 mRNA y 4000 moléculas del homodímero STAT1|STAT1). Al analizar los resultados arrojados por esta nueva simulación, podemos decir que la molécula STAT1 mRNA no se aproxima a los datos experimentales, ni cualitativa ni cuantitativamente. Aunque parezca que la simulación de la concentración de la proteína IRF1 se amolda cualitativa y cuantitativamente a los datos experimentales, se observa que al principio de la simulación, esta concentración aumenta mucho y demasiado rápido (Figura 6).

Respecto a la proteína STAT1 fosforilada, podemos decir que la forma de la curva es buena, pero no está lo suficientemente cercana a los datos cuantitativos experimentales,

incluso podríamos apuntar que existe una especie de “retardo” en el dominio del tiempo (Figura 7).

Sobre la proteína STAT1, sólo podemos afirmar que no se adapta ni a la forma ni a los valores cuantitativos experimentales, por lo que no se considera necesario mostrar dichos resultados en este estudio.

PROTEÍNA IRF1 ESTABLE E INESTABLE MEDIANTE STAT1|STAT2

Llegados a este punto, en el que los resultados obtenidos hasta ahora no son lo suficientemente buenos para nosotros, lo que nos queda es postular la tesis anterior con una modificación: hacer que el elemento que interviene en el cambio de estado de la proteína IRF1 en el citoplasma hacia un estado estable es el heterodímero STAT1|STAT2, en vez del homodímero STAT1|STAT1.

Este cambio es simplemente una prueba, para conocer si ésta nueva hipótesis que postulamos es válida o no, ya que no conocemos realmente, si ésta fuese correcta, cómo funciona internamente (si esta hipótesis fuese cierta, deberíamos replantearnos el modelo de señalización bioquímico completo).

Asumiendo la premisa dada, sólo debemos hacer un único cambio en el modelo matemático de que disponemos resultado de la aplicación de la hipótesis anterior (el elemento que interviene es STAT|STAT1), que es en la ecuación número 17, sustituyendo el uso del homodímero por el del heterodímero:

Ecuación 17 – IRF1 estable en el citoplasma:

$$\frac{d(IRF1_{stable})_c}{dt} = k_{activ_il} \cdot (STAT1_p | STAT2_p)_c - k_{ildeg} \cdot (IRF1_{stable})_c - i_{il_sn} \cdot (IRF1_{stable})_c + e_{il_sn} \cdot (IRF1_{stable})_n$$

Los resultados obtenidos en la simulación de este nuevo caso, no se fijan a los datos experimentales en ningún caso, ni cualitativa ni cuantitativamente. Debido a la comprobación de que esta hipótesis no es válida, ni matemática ni bioquímicamente (por lo conocido hasta ahora), no se muestra ningún dato, explicación ni gráfico de los resultados obtenidos en esta ocasión.

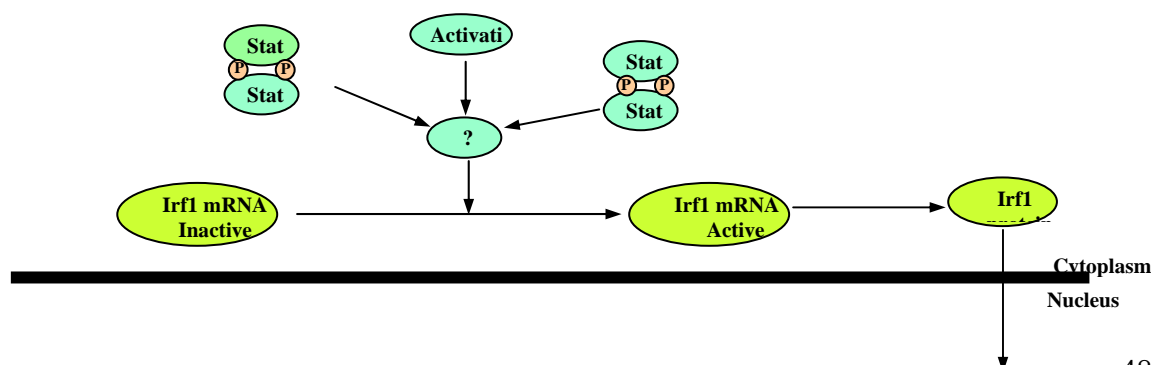
Por lo que simplemente concluimos que esta teoría, la aparición de dos estados diferentes, estable e inestable, de la proteína IRF1, funciona sólo de manera adecuada, si es el homodímero STAT1|STAT1 el factor de activación para la IRF1 estable (nótese que los valores cuantitativos pueden ser fijados mejor de lo que se ha hecho hasta ahora).

TRANSCRIPCIÓN ACTIVA E INACTIVA DE IRF1

En la tesis propuesta anteriormente, postulamos que el mRNA del IRF1 es creado *in novo* en el citoplasma, pero de manera que la molécula está en un estado inactivo. Entonces, tras la actuación de un factor desconocido, se cree que probablemente la molécula STAT1|STAT1 (sin descartar otras posibilidades), el mRNA de IRF1 inactivo pasa a estado activo. Por último, el mRNA IRF1 transcribe la proteína IRF1 en el citoplasma y ésta es importada al núcleo, donde el mecanismo de señalización funciona exactamente de la misma manera que se explicó anteriormente.

Los cambios que se ha necesitado hacer en este caso consisten básicamente en la incorporación de una variable más a nuestro sistema, la denominada “ki1prod” la cual, indica la tasa de producción constitutiva de mRNA IRF1. Se asume que el número inicial de moléculas de esta proteína es de 8 (este valor ha sido obtenido tras una serie de pruebas con diferentes valores, de manera que el valor dado es el más adecuado y ajustado a nuestras necesidades de fijación a los datos experimentales). Nótese en este punto, que en esta hipótesis hemos despreciado la presencia de la proteína PIAS, y que mantenemos una tasa de creación y fosforilación de homodímeros STAT1|STAT1 en el núcleo. Es importante, por último, fijarse que en este caso, nuestro bloque de ecuaciones diferenciales posee una ecuación menos, ya que sólo con 4 ecuaciones el mecanismo de señalización del IRF1 queda definido en su completitud.

La siguiente figura muestra cómo queda el mecanismo de señalización tras aplicar nuestra nueva hipótesis:



TRANSCRIPCIÓN ACTIVA E INACTIVA DE IRF1 CON STAT1|STAT1

En la tesis que presentamos a continuación, suponemos que el factor de activación para el mRNA IRF1 es el homodímero STAT1|STAT1 presente en el citoplasma.

Tenemos que cambiar el fichero que implementa el modelo (suponemos que la variable “ki1prod” ya ha sido incluida en el fichero de parámetros y que todos los cambios necesarios para que el programa se ejecute correctamente se han llevado a cabo, como por ejemplo la manera en que los gráficos se muestran), desestimando la ecuación número 19 en el conjunto de ecuaciones, y reescribiendo las número 15, 16, 17 y 18 quedando éstas como se muestra a continuación:

Ecuación 15 – Transcripción de IRF1 inactivo en el citoplasma:

$$\frac{d(IRF1_{t_inactive})_c}{dt} = k_{i1_prod} - k_{i1deg} \cdot (IRF1_{t_inactive})_c + v_{transcription} \cdot (STAT1_p | STAT1_p)_n - k_{activ_i1} \cdot (STAT1_p | STAT1_p)_c \cdot (IRF1_{t_inactive})_c$$

Ecuación 16 – Transcripción de IRF1 activo en el citoplasma:

$$\frac{d(IRF1_{t_active})_c}{dt} = k_{activ_i1} \cdot (STAT1_p | STAT1_p)_c \cdot (IRF1_{t_inactive})_c - k_{i1deg} \cdot (IRF1_{t_active})_c$$

Ecuación 17 – Proteína IRF1 en el citoplasma:

$$\frac{d(IRF1_{protein})_c}{dt} = translation_blocking \cdot k_{transl} \cdot (IRF1_{t_active})_c - k_{i1deg} \cdot (IRF1_{protein})_c - i_{i1_pn} \cdot (IRF1_{protein})_c + e_{i1_pn} \cdot (IRF1_{protein})_n$$

Ecuación 18 – Proteína IRF1 en el núcleo:

$$\begin{aligned} \frac{d(IRF1_{protein})_n}{dt} = & k_{v_{il_pc}} \cdot (IRF1_{protein})_c - k_{v_{il_pn}} \cdot (IRF1_{protein})_n - k_{ildeg} \cdot (IRF1_{protein})_n \\ & - k_{slil} \cdot (IRF1_{protein})_n \cdot (STAT1)_n - k_{inv_slil} \cdot (IRF1_{protein} | STAT1)_n \end{aligned}$$

Al ejecutar la simulación de esta hipótesis, se aprecia que el mRNA IRF1 y la proteína IRF1 en el núcleo, ambas funcionan bastante bien, se aproximan de manera satisfactoria a los datos experimentales: primero hay un máximo (aproximadamente 58 moléculas) en la hora 2 de la simulación, entonces, hay un decremento en la cantidad de moléculas hasta alcanzar aproximadamente una cantidad de 25 moléculas, para después volver a crecer suavemente y estabilizarse la concentración hacia un valor constante de unas 23 moléculas (nótese que la cantidad exacta de moléculas no es lo importante, sino conocer cómo se comporta este mecanismo de señalización; los datos cuantitativos sólo sirven para comprobar el grado de aceptación de las hipótesis). Por tanto, la curva que representa la evolución de los homodímeros STAT1|STAT1 en el núcleo también se comporta como se esperaba: la misma forma, algo adelantada en el tiempo, alcanzando la cantidad de 14000 moléculas aproximadamente en el máximo y disminuyendo después hasta alcanzar la cantidad constante de 2000 moléculas al final de la simulación (Figura 8).

No obstante, el mRNA STAT1 y el conteo total de proteínas STAT1 no funciona de forma apropiada, al menos como se supone que debía. Sorprendentemente, la simulación nos da unos resultados no precisamente malos hablando sobre STAT1 fosforilado, pero se cree que, aún siendo esta la hipótesis que más se asemeja al comportamiento de los datos experimentales, no es lo suficientemente buena como para darla como válida para los objetivos de este estudio. Es por esto que los resultados de estas simulaciones no se muestran aquí.

TRANSCRIPCIÓN ACTIVA E INACTIVA DE IRF1 CON STAT1|STAT2

La hipótesis a probar en este punto es muy parecida a la anterior. La principal diferencia yace en el tipo de compuesto usado como factor de activación, que en este caso probaremos si es el heterodímero STAT1|STAT2. Se cree que esta teoría no funcionará mejor que la anterior, en la que usábamos el homodímero como factor de activación, pero aún así, es necesario testar si esta tesis es cierta o no, ya que en un estudio como este, no podemos aseverar ninguna hipótesis como cierta o falsa sin haber comprobado antes empíricamente su autenticidad.

Debido a esto, hacemos los cambios necesarios en el modelo, que de hecho, sólo consiste en transformar las ecuaciones 15 y 16 del modelo obtenido en la hipótesis anterior, quedando de la siguiente manera:

Ecuación 15 – Transcripción de IRF1 inactiva en el citoplasma:

$$\frac{d(IRF1_{t_inactive})_c}{dt} = k_{il_prod} - k_{il_deg_t} \cdot (IRF1_{t_inactive})_c + v_{transcription} \cdot (STAT1_p | STAT2_p)_n - k_{activ_il} \cdot (STAT1_p | STAT1_p)_c \cdot (IRF1_{t_inactive})_c$$

Ecuación 16 – Transcripción de IRF1 activa en el citoplasma:

$$\frac{d(IRF1_{t_active})_c}{dt} = k_{activ_il} \cdot (STAT1_p | STAT2_p)_c \cdot (IRF1_{t_inactive})_c - k_{il_deg_t} \cdot (IRF1_{t_active})_c$$

Después de haber realizado la simulación, podemos afirmar que los resultados obtenidos son precisamente los esperados, ninguna de las moléculas ni compuestos se aproximan de manera óptima a los datos experimentales, ni cuantitativa ni cualitativamente, por lo que los gráficos resultantes de esta simulación no se adjuntan en este documento.

TRANSCRIPCIÓN ACTIVA E INACTIVA DE IRF1 CON ACTIVACIÓN

En esta parte de nuestro estudio, comprobaremos la última hipótesis que nos hemos formulado, (transcripción activa e inactiva de IRF1), sólo que con una pequeña modificación. En vez de usar una molécula o compuesto como factor de activación, veremos si ésta teoría funciona usando un factor de activación incluido intrínsecamente en el mRNA IRF1 inactivo. Esto significa que suponemos que el mRNA IRF1 inactivo puede cambiar de estado a mRNA IRF1 activo por sí mismo, sin intervención de molécula externa alguna.

De este modo, el fichero en el que se detalla el modelo matemático sólo cambia en las ecuaciones 15 y 16, como en la hipótesis anterior, quedando de la siguiente forma:

Ecuación 15 – Transcripción de IRF1 inactiva en el citoplasma:

$$\frac{d(IRF1_{t_inactive})_c}{dt} = k_{il_prod} - k_{il_deg_t} \cdot (IRF1_{t_inactive})_c + v_{transcription} \cdot (STAT1_p | STAT2_p)_n - k_{activ_il} \cdot (IRF1_{t_inactive})_c$$

Ecuación 16 – Transcripción de IRF1 activa en el citoplasma:

$$\frac{d(IRF1_{t_active})_c}{dt} = k_{activ_il} \cdot (IRF1_{t_inactive})_c - k_{il_deg_t} \cdot (IRF1_{t_active})_c$$

A la vista de los resultados obtenidos, apreciamos que éstos son similares a los que manejamos cuando simulamos usando el heterodímero STAT1|STAT2 como factor de activación (igual de poco favorables, al menos), por tanto no mostraremos dichos resultados tampoco en este punto.

CONCLUSIÓN

La conclusión final que educimos tras haber hecho las simulaciones correspondientes a las hipótesis de que disponemos es que, en lo que concierne a los mecanismos de señalización del IFN- β , la hipótesis que mejor se adapta a los datos experimentales, y por lo tanto, más cercana a la realidad bioquímica, es la que nos dice que el mRNA IRF1 puede presentarse en dos estados distintos en el citoplasma: forma activa y forma inactiva mediante la acción del homodímero STAT1|STAT1 como factor de activación. Sin embargo, los datos obtenidos, no son lo suficientemente buenos como para afirmar taxativamente que el mecanismo de señalización funciona de esta manera, al menos en la línea celular estudiada, por lo que señalamos que las investigaciones deben continuar, siguiendo este camino, el del mRNA IRF1 activo e inactivo en el citoplasma, ya que, a pesar de que los resultados manejados no son los más favorables, hemos podido acotar las líneas de investigación hacia esta hipótesis.

REFERENCES

1. Jaroslaw S: *Model-based analysis of Interferon- β induced signalling pathway*
2. Janeway C: *Immunobiology 5: the immune system in health and disease*. Garland Pub, New York, USA, 2001.
3. Akira S, Takeda K: *Toll-like receptor signaling*. *Nat Immunol* 2004, 4: 499–511.
4. Jamaluddin M, Wang S, Garofalo RP, Elliott T, Casola A, Baron S, Brasier AR: *IFN- β mediates coordinate expression of antigen-processing genes in RSV-infected pulmonary epithelial cells*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001, 280: L248–L257.

LIST OF FIGURES

Figure 1

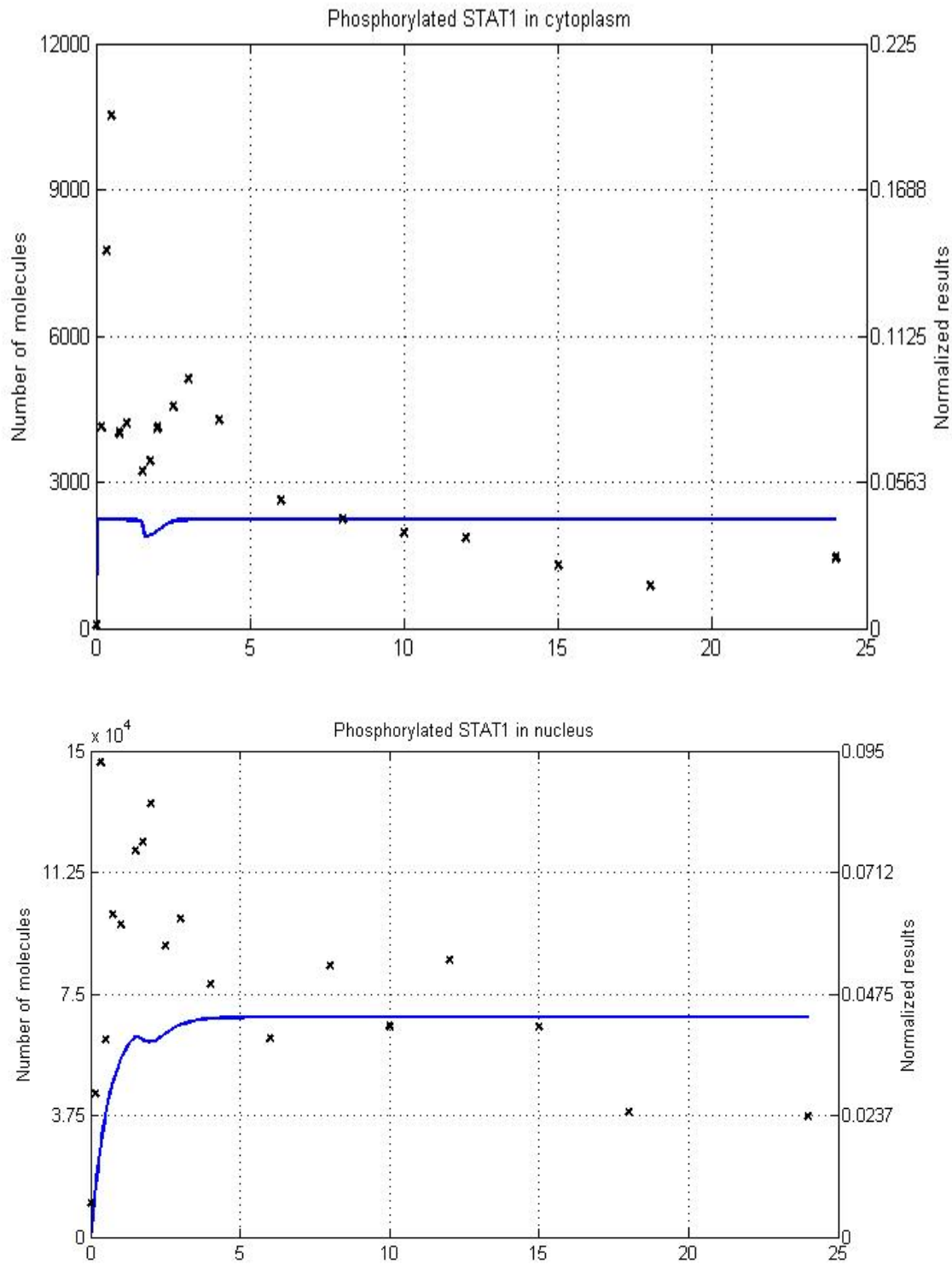


Figure 2

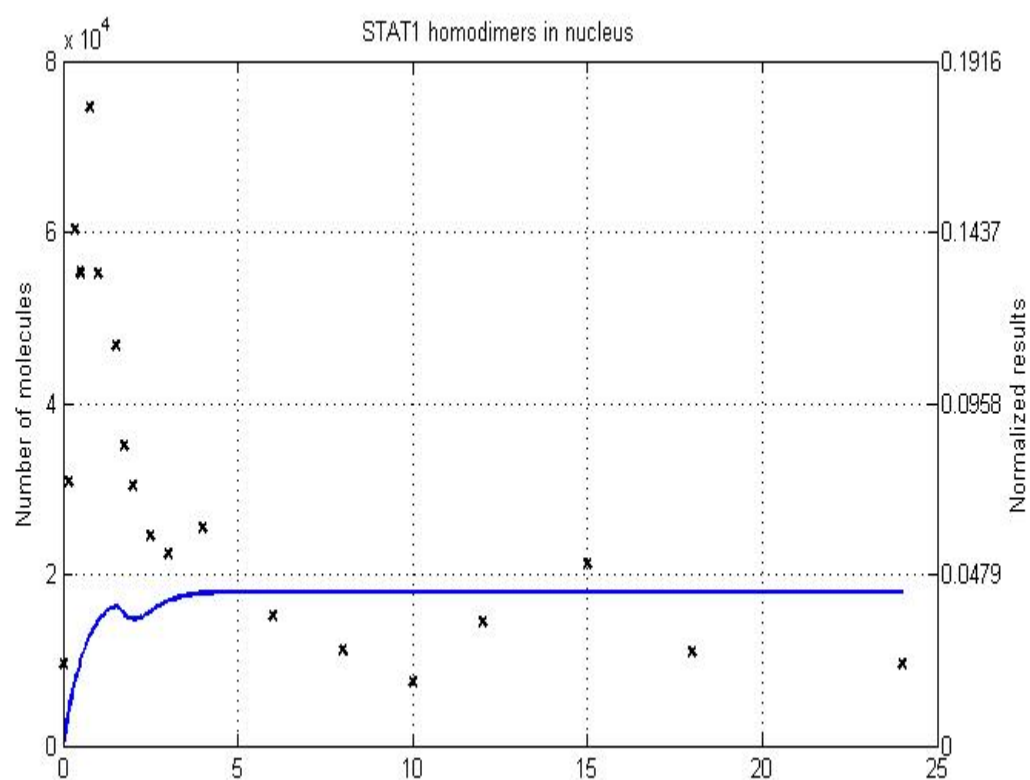
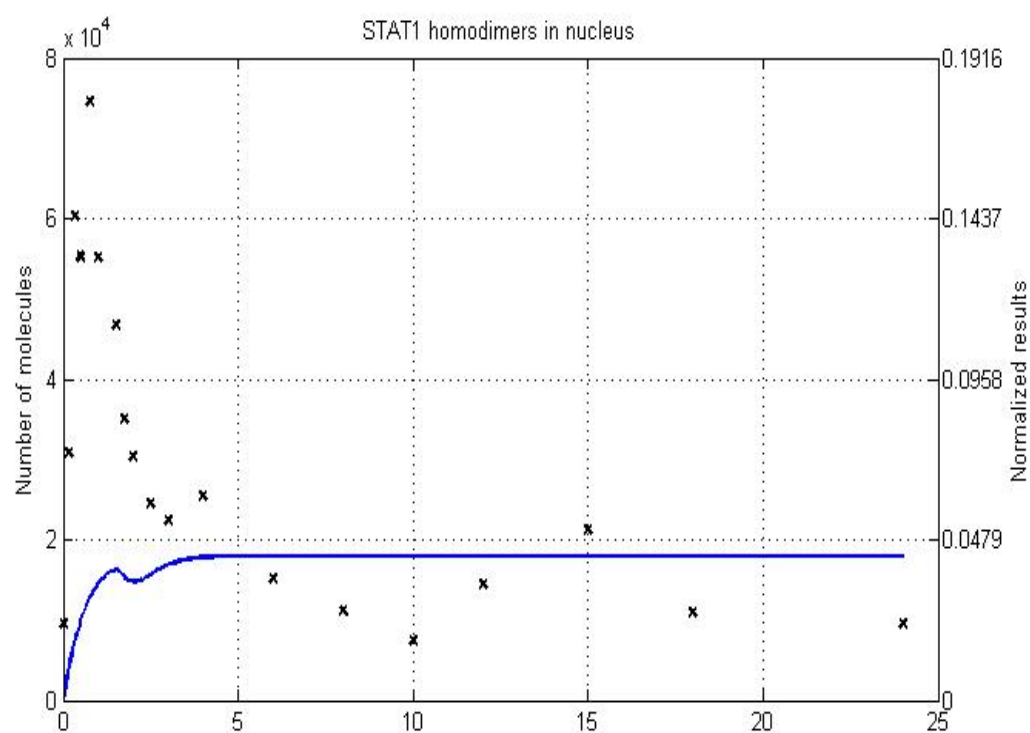


Figure 3

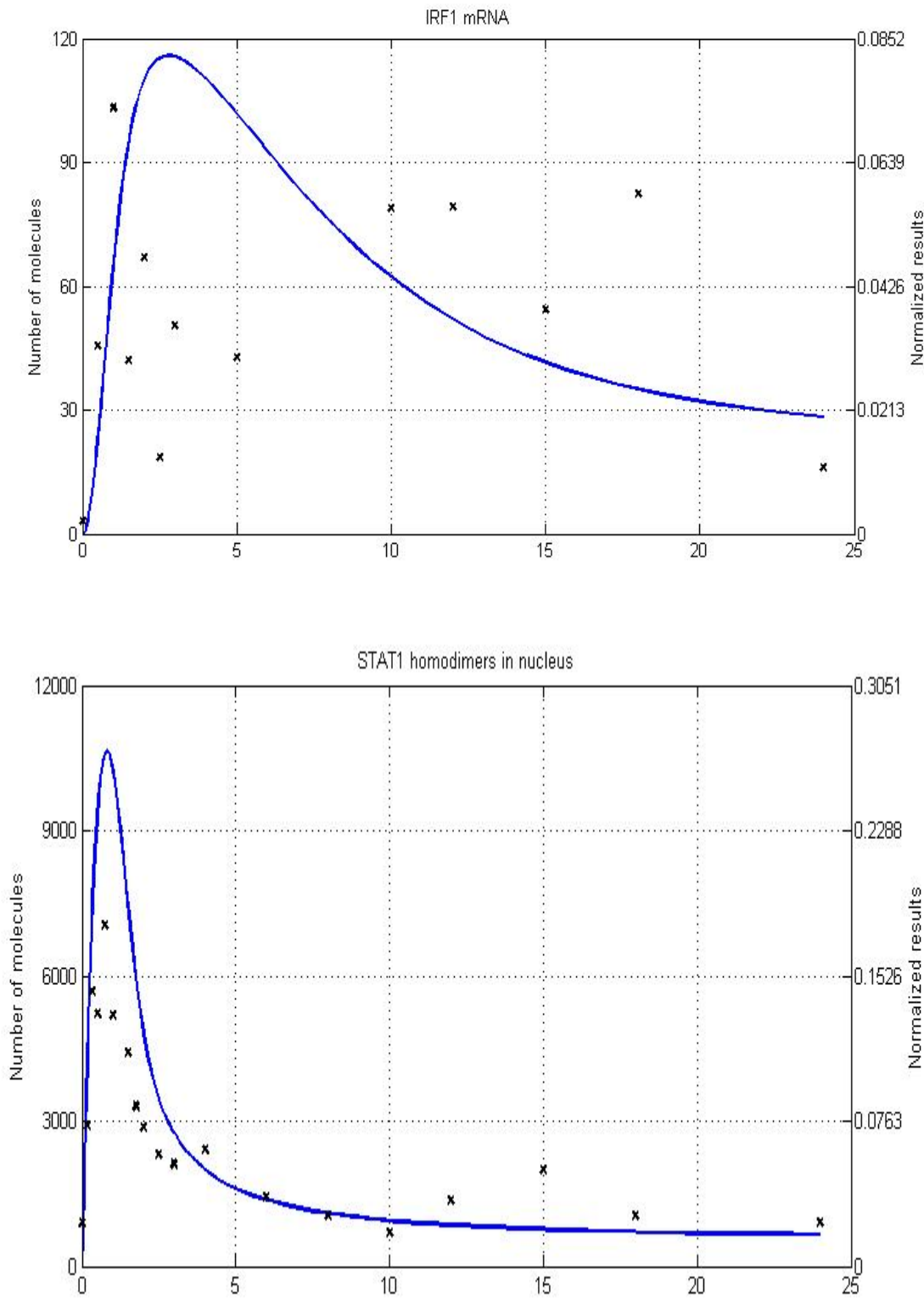
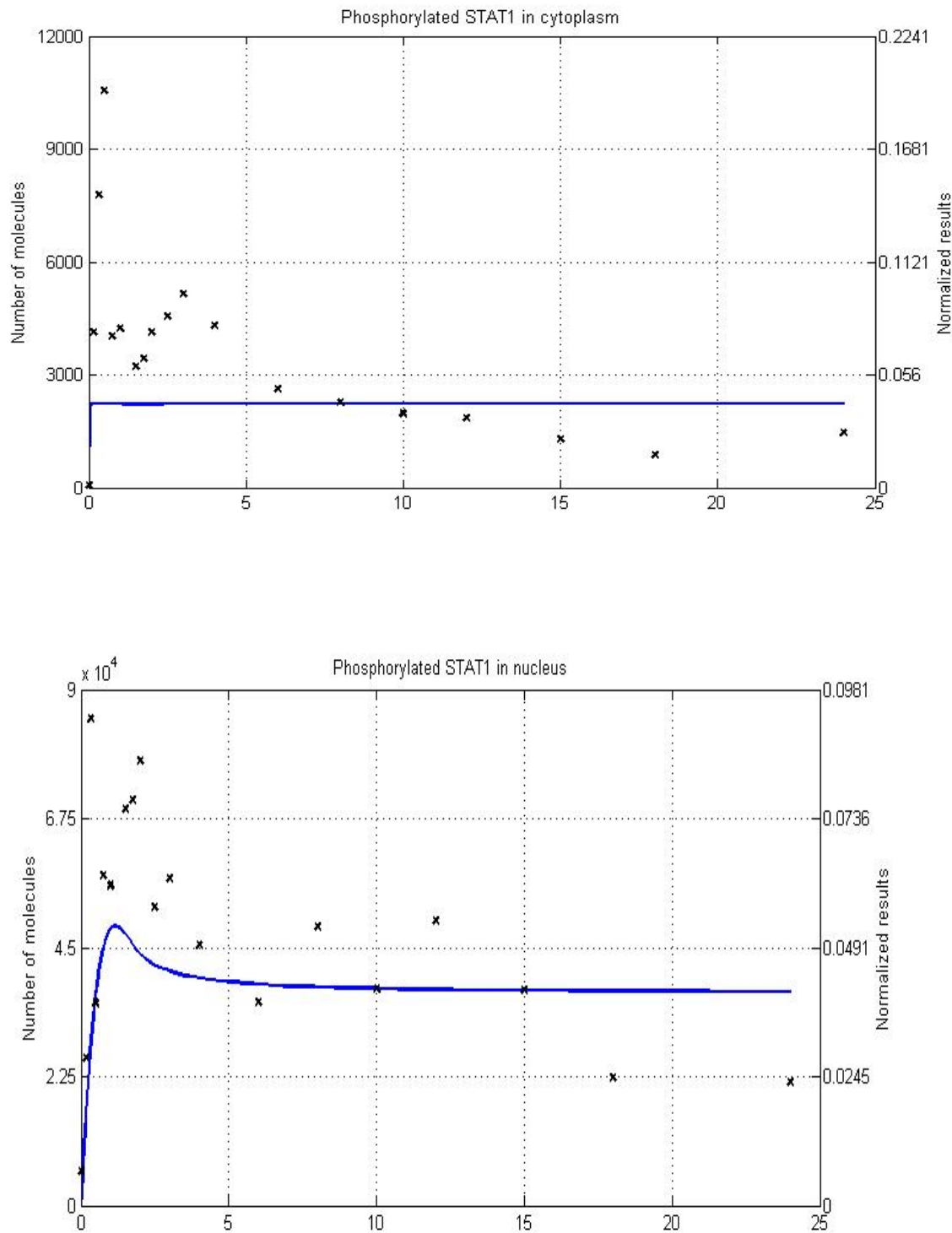


Figure 4



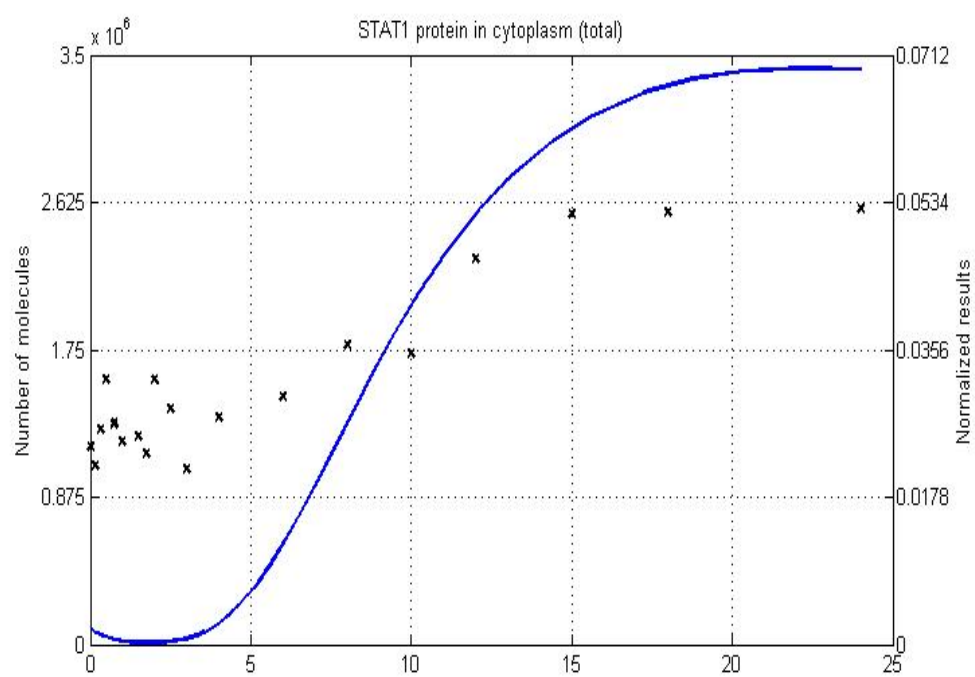
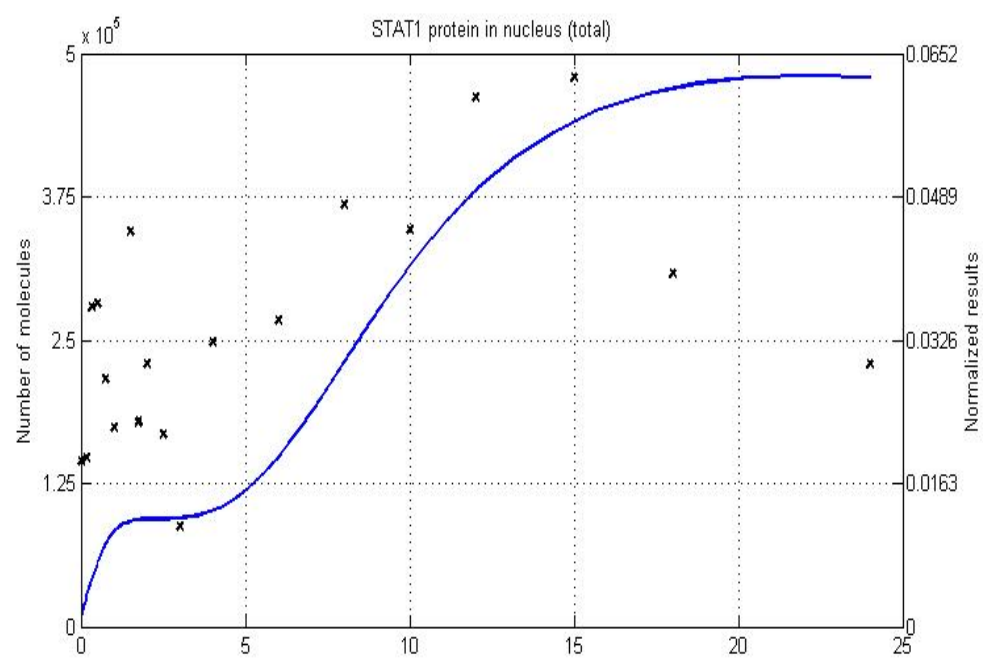


Figure 5

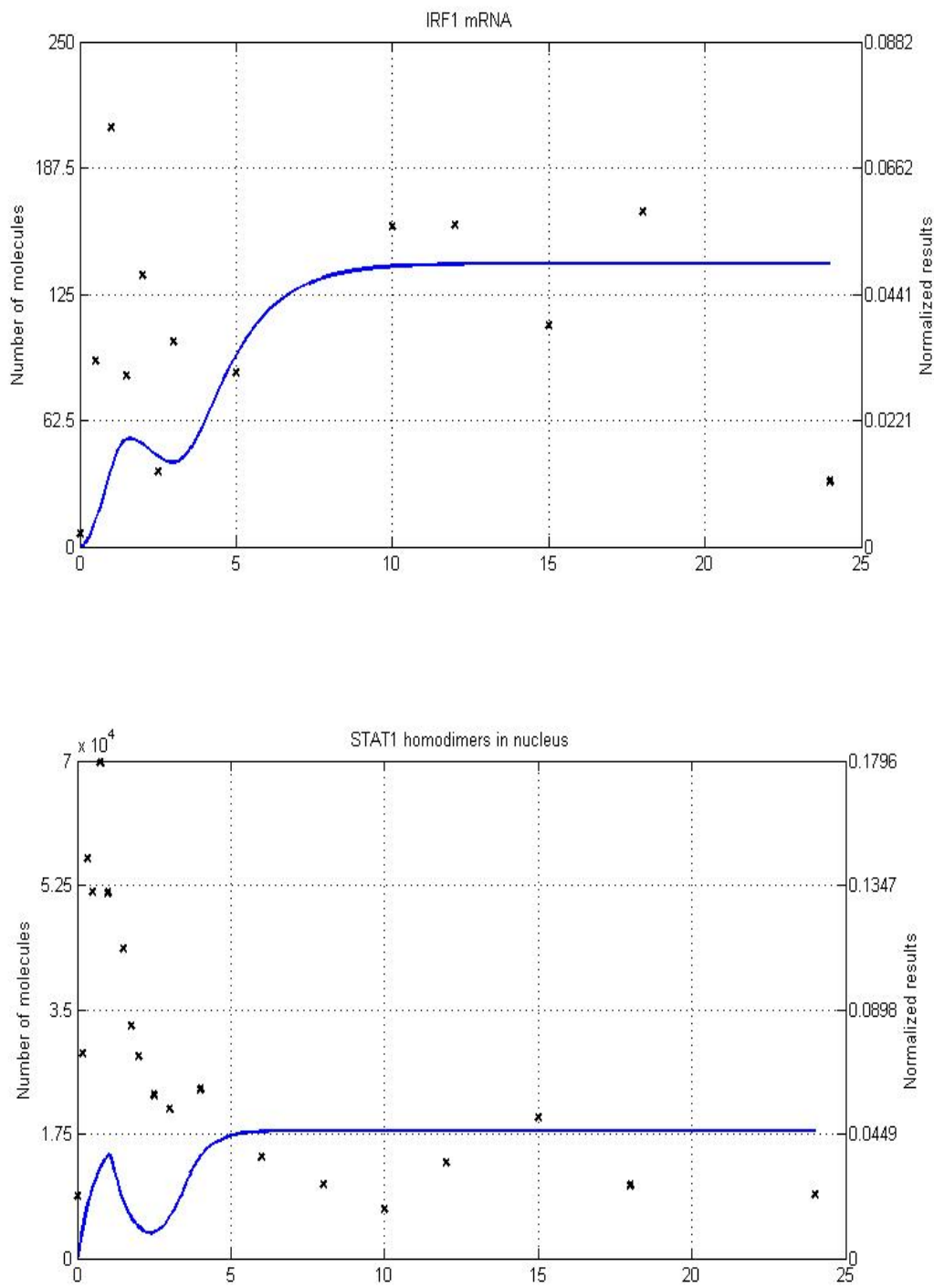


Figure 6

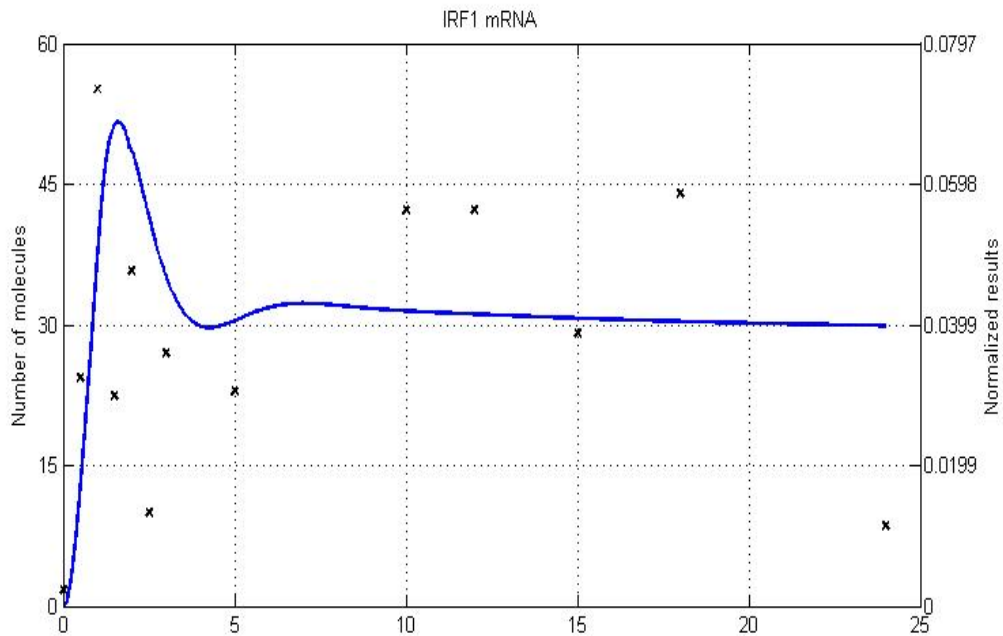
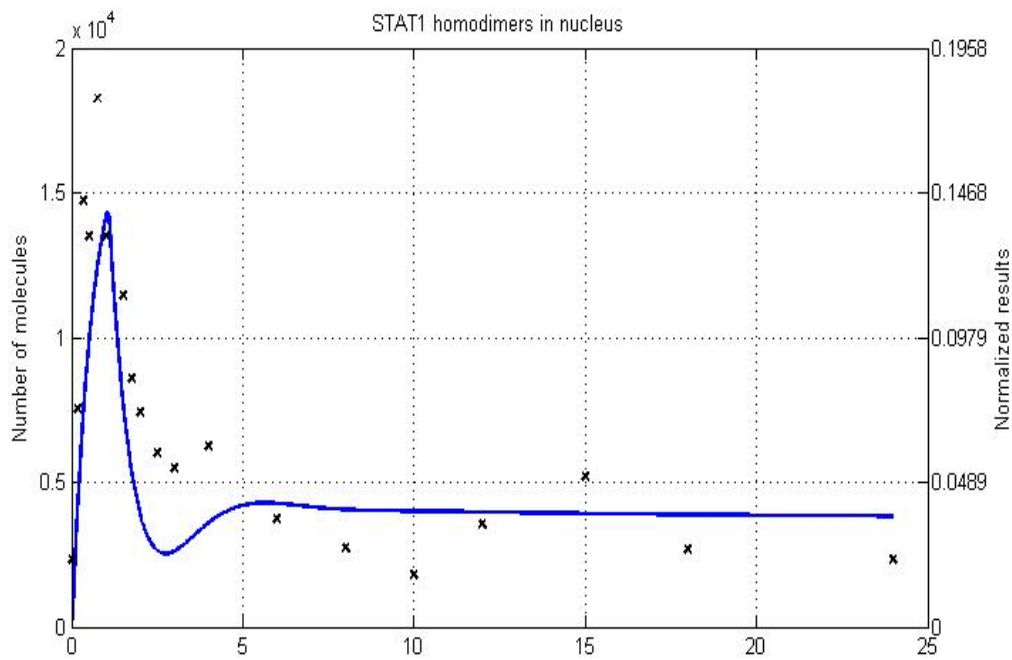


Figure 7

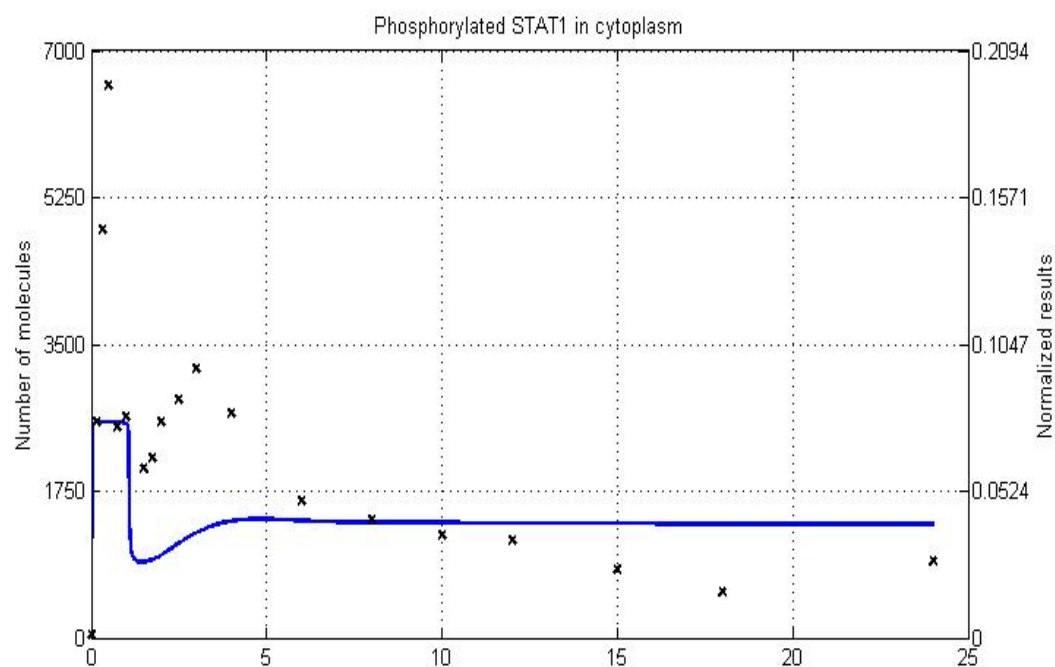
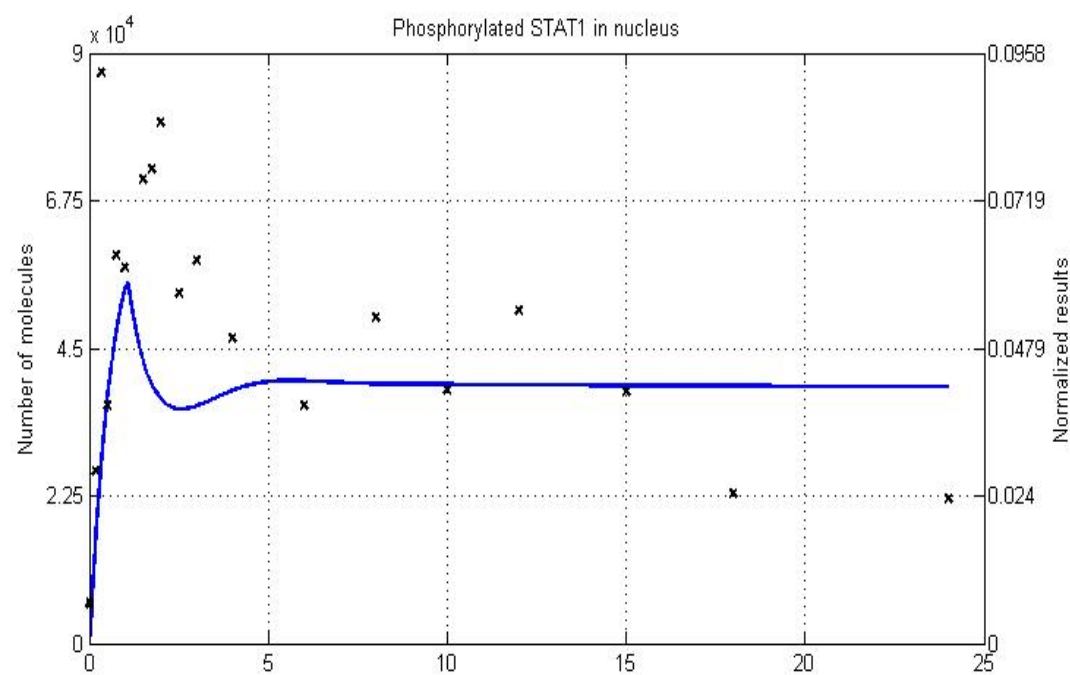


Figure 8

